口腔
分子生物学

KOUQIANG
FENZI
SHENGWUXUE

● 主编 · 陈谦明



军事医学科学出版社

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

VISIT…

LANZAROTE Caliente.com

口腔分子生物学

◇ 责任编辑　朱辅华 蒋长亨
◇ 插　　图　宋　琦
◇ 封面设计　进取工作室

ISBN 7-80121-248-7
9 787801 212481 >

ISBN 7-80121-248-7/R·224
定价：19.80元

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

微信公众号

口腔视频

微信搜索qzkqsp1即可关注

福利1

关注后可观看正畸、修复、种植等精彩内容

福利2

关注后领取口腔解剖病理学视频讲座全集

福利3

加入视频分享交流群，解答疑难病例，获取更多视频资源

扫二维码，关注公众号
领取更多口腔资料

口腔分子生物学

陈谦明　主编

李秉琦　审阅

编者(按汉语拼音排列)

陈谦明　L. P. Samaranayake

罗　刚　聂敏海　唐高妍

武云霞　曾　昕　赵　蔓

钟　利　周　敏

军事医学科学出版社

·北　京·

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

内 容 提 要

本书系统介绍了口腔分子生物学的理论与应用成果。主要内容有牙发育、唇腭裂的发生、口腔微生物、口腔颌面部肿瘤、基因治疗、唾液的分泌调节、粘附分子与角蛋白等的分子生物学。为阅读方便,作者还简要地、以图示的方式介绍了分子生物学的基础理论和常用技术。

本书既可供口腔医学本科生、研究生及口腔医学研究人员参考,也可作为广大临床口腔医学工作者更新知识、提高口腔颌面部疾病的防治水平的参考书。

* * *

图书在版编目(CIP)数据

口腔分子生物学/陈谦明主编. -北京:军事医学科学出版社,2000.8

ISBN 7-80121-248-7

Ⅰ.口… Ⅱ.陈… Ⅲ.口腔科学:分子生物学 Ⅳ.R780.2

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2000)第 62647 号

* *

军事医学科学出版社出版

(北京市太平路 27 号 邮政编码:100850)

新华书店总店北京发行所发行

潮河印刷厂印刷

*

开本:787mm×1092mm 1/16 印张:14.25 字数:349 千字

2000 年 10 月第 1 版 2000 年 10 月第 1 次印刷

印数:1-3000 册 定价:19.80 元

(购买本社图书,凡有缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换)

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频

口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

主 编 简 介



陈谦明，男，1963 年 6 月生，华西医科大学口腔医学院教授、中华口腔医学会口腔粘膜病专业委员会常务委员、国际牙科研究协会（IADR）会员。1992 年获口腔医学博士学位，师从李秉琦、萧卓然教授；1992 ~ 1994 年受遗传学博士后培训，师从傅继梁、杨光华教授。后到香港大学工作与研修 3 年。主研方向为口腔癌前损害发生与防治的分子生物学。主持与参加多项国家、部（委）、省相关课题的研究，在国内外专业期刊发表研究论文 50 余篇，主编或参编学术专著 12 部，获部（委）、省级成果奖 6 项，并先后多次赴美国、加拿大、新加坡等国家和欧洲、台湾等地区参加国际学术研讨会进行学术交流。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

序

20世纪生命科学的突飞猛进，有赖于分子生物学研究的兴起，而分子生物学在口腔医学的应用也极大地推动着口腔医学的进一步发展。事实证明，分子生物学在包括口腔医学在内的医学领域中已经结出了丰硕的成果。

此书是我国第一部口腔分子生物学专著，编著者以专题的方式，较系统全面地介绍了口腔分子生物学的理论与应用成果，并且还简要地介绍了一些常用的分子生物学技术与基本理论，以便于读者理解和应用。

主编陈谦明教授是青年口腔医学专家，编者也主要是年轻的学子。他们以自己的研究工作为基础，结合国内外的最新进展写成此书，体现了“新、快、全”的特点，也体现了青年医学工作者锲而不舍、朝气蓬勃的精神。

我有幸较早地拜读了此书，除增长不少学识之外，深感这是一部新颖、全面、集理论性与实用性为一体的专著。相信此书的出版对读者会有很大的裨益。故我乐于在新世纪伊始将此书介绍给广大的口腔医学临床工作者和研究人员，让我们为创建新的辉煌而共同努力。

李秉琦

1999年12月

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

自　序

有学者指出，21世纪是生命科学世纪，而生命科学发展的首要动力来源于分子生物学的兴起与发展，足见分子生物学的理论和方法对从事生命科学学习与研究人员的重要性。同样，分子生物学在口腔医学领域的应用和发展，已经并且正在极大地推动着口腔医学的进一步发展，并取得了丰硕的成果。有鉴于此，早在1992年，我还在博士后流动站接受基础医学理论与技术培训的时候，就打算结合自己的研究课题，将分子生物学的理论和方法应用于口腔医学领域所取得的成果总结成集，为从事相关领域学习与研究的人员提供一部集理论性与实用性为一体的参考专著。并在有关导师、编辑部门的支持下立题，甚至签下了出版合同。但时光流逝，此书却迟迟没有着落。究其原因有三，其一当然是自己才疏学浅，分子生物学涉及学科领域广泛，新知识与新理论层出不穷，自己都还没有完全掌握，又如何能够转授于人；其二是分子生物学的理论和方法在口腔医学领域的应用研究工作在国内外都还处于方兴未艾的阶段，其理论和成果的完善尚需假以时日；其三是这些研究成果散在于浩瀚的文献大海之中，而在祖国内地获得这些文献的机会有限。因此，对此宿愿也就只有一拖再拖了。直到1998年，我有幸来到了信息灵敏、东西方文化荟萃于一炉的香港大学学习和工作，使我接触到了大量梦寐以求的资料，才使我编写这本专著的心愿得以完成。

口腔分子生物学随着分子生物学的理论与方法在口腔医学领域的应用而诞生，至今还没有确切的定义与研究范围的界定；但是，它与分子生物学的关系应该是属于一般与特殊的关系。考虑到这一点，在此书的体例上基本上采用的是首先概述分子生物学原则，然后，强调口腔医学领域在应用该原则和方法上的特殊性、注意事项及取得的相应成果。此外，尽管分子生物学强调涉及到DNA与RNA的理论与方法，尤其是涉及到克隆这些分子到宿主细胞中的技术，但许多分子生物学的技术来源于传统的生物化学技术，涉及到DNA－RNA－蛋白质这一中心法则的所有环节，同时也包含判定大分子所涉及到的免疫学技术。因此，在成果的取舍上强调了核酸技术的成果而又不仅局限于核酸技术。需再次强调的是，此书所涉及到的理论、方法与成果更新迅速，虽然在编著时相对成熟，但不排除在较短的时间内被修正或取代的可能，敬请读者留意。此外，要想以三十几万字的容量包罗所有该领域所涉及到的专题也是不现实的，一些主要涉及一般理论的专题，如伤口愈合过程中的分子生物学、炎性介质的分子生物学等，只有烦请读者参考其他相关的分子生物学书籍了。如果此书能够为读者的研究工作、理论学习带来一点点裨益的话，编著者们一定会倍感欣慰。当然，受条件与知识面所限，错误在所难免，恳请读者多多指正，便于再版时修正，以免贻害后人。

最后，我要感谢在我人生成长与学习进步的几个阶段上给予我指导的导师们，包括已故的萧卓然教授，健在的李秉琦教授、杨光华教授和傅继梁教授，以及在香港大学的合作教授L. P. Samaranayake，没有他们十几年如一日的传道授业、谆谆教诲，不可能有我在学术领域的成长，也不可能有此书的完成与面世。我还要感谢在华西医科大学口腔医学院工作和学习的一批年轻学者，他们知识面宽广，既受过专业的口腔医学教育，又有着良好的分子生物学知识，他们为此书的完成，做了大量的具体工作，没有他们的努力，此书也是不可能完成的。我还要感谢华西医科大学及其口腔医学院的领导们，从一开始，他们就将此书列为基础口腔医学丛书的一部分，给予了支持和协助。我还要特别感谢华西医科大学第四编辑室的蒋长亨主任，自1992年

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

我有着手编写此书的想法起，他自始至终是我完成此书最强有力的支持者，尤其是在编写过程中遇到困难时，给予我支持和帮助。应该说，没有他的鼓励，可能我早已放弃此书的编著工作了。最后，我还要感谢一直默默无闻、荣辱与共地站在我身后，给予我力量与动力的娇妻与爱女。

陈谦明

1999年12月于香港

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

目　录

第一章　概论……………………………………………………………… (1)
第一节　分子医学的兴起与发展……………………………………………… (1)
第二节　口腔分子生物学的发展与成果……………………………………… (2)
一、龋病替代疗法 ………………………………………………………… (2)
二、基因工程防龋疫苗 …………………………………………………… (3)
三、颌面部发育的基因调控 ……………………………………………… (3)
四、口腔微生物种型鉴定 ………………………………………………… (4)
五、口腔粘膜病病原因子的认识与修正 ………………………………… (4)
六、口腔癌的早期诊断与治疗 …………………………………………… (4)
七、口腔疾病的基因治疗 ………………………………………………… (5)
第三节　我国口腔分子生物学的发展………………………………………… (5)
一、原癌基因与头颈部肿瘤 ……………………………………………… (5)
二、牙周组织疾病的分子机制 …………………………………………… (7)
三、致龋菌毒力因子及基因工程防龋疫苗 ……………………………… (7)
第四节　我国口腔分子生物学进一步发展的策略…………………………… (7)
第二章　常用分子技术……………………………………………………… (9)
第一节　脱氧核糖核酸及核糖核酸………………………………………… (9)
一、DNA 的来源 …………………………………………………………… (9)
二、DNA 的结构与功能…………………………………………………… (9)
三、RNA ………………………………………………………………… (10)
四、cDNA ………………………………………………………………… (10)
五、DNA 探针 …………………………………………………………… (12)
第二节　DNA 定位图谱 …………………………………………………… (12)
一、限制性内切核酸酶 ………………………………………………… (12)
二、Southern 分析 ………………………………………………………… (14)
第三节　DNA 扩增 ………………………………………………………… (15)
一、PCR ………………………………………………………………… (15)
二、PCR 的不足 ………………………………………………………… (16)
三、PCR 变异 …………………………………………………………… (16)
第四节　DNA 克隆 ………………………………………………………… (16)
一、策　略 ……………………………………………………………… (16)
二、克隆系统 …………………………………………………………… (17)
第五节　DNA 测序 ………………………………………………………… (19)
一、人工测序方法 ……………………………………………………… (19)
二、自动测序方法 ……………………………………………………… (19)
第六节　定位克隆 ………………………………………………………… (21)

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

一、功能性克隆 …… (21)
二、基因图 …… (22)
三、物理图谱 …… (23)
四、基因解码 …… (24)
第七节　突变分析 …… (24)
一、DNA 缺失的检测 …… (24)
二、检测点突变 …… (24)
三、筛选 DNA …… (24)
四、点突变的证实 …… (26)
第八节　染色体分析 …… (26)
一、染色体核型 …… (26)
二、荧光素原位杂交 …… (27)
三、体细胞杂交 …… (28)
第九节　重组 DNA 的表达 …… (28)
一、体外表达 …… (28)
二、体内表达 …… (29)
第三章　牙发育及先天性唇腭裂的分子生物学 …… (31)
第一节　造釉蛋白的分子生物学 …… (31)
一、概　述 …… (31)
二、造釉蛋白的基因调控 …… (32)
三、造釉蛋白的分泌 …… (34)
四、造釉蛋白的结构 …… (36)
五、胞外造釉蛋白的降解 …… (36)
六、造釉蛋白的功能 …… (42)
第二节　牙发育过程中的基因调控 …… (44)
一、牙胚发育的启动阶段 …… (44)
二、间充质凝聚区的形成和增殖 …… (49)
三、牙齿发育后期的基因调控 …… (53)
四、小　结 …… (55)
第三节　唇腭裂的分子生物学机制 …… (55)
一、转化生长因子 – α …… (55)
二、4p16 区位的 Msx1 基因 …… (56)
三、17q21 区位的维 A 酸受体 – α 基因 …… (56)
四、唇腭裂中基因与环境因素的相互作用 …… (56)
五、小　结 …… (56)
第四章　常见口腔微生物的分子生物学 …… (58)
第一节　龋病微生物的分子遗传与分子生物学 …… (58)
一、致龋性链球菌突变株的分离 …… (58)
二、口腔链球菌分子遗传学特性 …… (59)

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

三、口腔链球菌的分子克隆 ……………………………………………………… (63)
第二节 牙周厌氧菌的分子遗传与分子生物学 …………………………………… (69)
一、总 论 ……………………………………………………………………… (69)
二、实用性分子成分 …………………………………………………………… (70)
三、克隆及插入突变 …………………………………………………………… (71)
四、口腔内的普氏菌及卟啉单胞菌 …………………………………………… (71)
五、放线菌 ……………………………………………………………………… (72)
六、放线杆菌 …………………………………………………………………… (72)
七、拟杆菌等位交换突变 ……………………………………………………… (73)
八、诊断探针 …………………………………………………………………… (73)
九、牙周细菌的传播 …………………………………………………………… (73)
第三节 单纯疱疹病毒的分子生物学 …………………………………………… (77)
一、HSV DNA 的结构与功能 ………………………………………………… (78)
二、HSV 的复制 ………………………………………………………………… (84)
三、HSV 蛋白质 ………………………………………………………………… (85)
四、HSV 的潜伏感染 …………………………………………………………… (87)
五、治疗 HSV 感染的分子生物学基础 ………………………………………… (88)
第四节 人类乳头瘤病毒的分子生物学 ………………………………………… (89)
一、HPV 基因组组成 …………………………………………………………… (89)
二、HPV 种系与癌 ……………………………………………………………… (91)
三、正常口腔组织中的 HPV …………………………………………………… (92)
四、HPV 的传播方式 …………………………………………………………… (92)
五、HPV 致癌作用的分子机制 ………………………………………………… (93)
第五章 人类口腔癌的分子生物学 ………………………………………… (95)
第一节 概 述 …………………………………………………………………… (95)
第二节 口腔癌与癌基因 ………………………………………………………… (96)
一、逆转录病毒与病毒癌基因 ………………………………………………… (96)
二、原癌基因 …………………………………………………………………… (97)
三、癌基因的激活 ……………………………………………………………… (98)
四、口腔癌与癌基因 …………………………………………………………… (99)
第三节 口腔癌与肿瘤抑制基因 ………………………………………………… (101)
一、实验性证据 ………………………………………………………………… (101)
二、肿瘤的形成 ………………………………………………………………… (103)
三、口腔癌与肿瘤抑制基因 …………………………………………………… (104)
四、口腔生长抑制因子和信号转导通路 ……………………………………… (111)
第四节 DNA 修复基因 …………………………………………………………… (111)
一、修复的生物学 ……………………………………………………………… (111)
二、DNA 修复与癌 ……………………………………………………………… (112)
第五节 外源因素致口腔癌的分子基础 ………………………………………… (113)

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

一、环境因素致口腔癌的分子基础 …… (113)
二、人类乳头状瘤病毒与口腔癌 …… (114)
第六节 口腔癌发生的分子模型 …… (119)
第七节 口腔癌的分子诊断 …… (119)
第八节 口腔癌的遗传易感性 …… (121)
一、肿瘤易感性的概念 …… (121)
二、头颈部肿瘤易感性的临床证据 …… (121)
三、肿瘤易感性检测方法的应用 …… (126)
第六章 口腔疾病的基因治疗 …… (130)
第一节 基因治疗的基本流程 …… (130)
一、确定目的基因 …… (130)
二、重组载体 …… (130)
三、筛 选 …… (130)
四、导 入 …… (130)
五、疗效观察 …… (130)
第二节 转基因体系 …… (131)
一、逆转录病毒 …… (132)
二、腺病毒和腺相关病毒 …… (136)
三、单纯疱疹病毒 …… (138)
四、天花病毒 …… (139)
五、非病毒性基因转导方法 …… (139)
第三节 启动子 …… (139)
第四节 基因治疗的应用 …… (140)
一、肿瘤的基因治疗 …… (140)
二、感染性疾病的基因治疗 …… (141)
第五节 口腔疾病的基因治疗 …… (141)
一、口腔癌与癌前损害 …… (141)
二、白色念珠菌感染 …… (143)
三、涉及粘膜角化上皮细胞的基因治疗 …… (144)
四、涉及唾液腺的基因治疗 …… (144)
五、其他可开发的基因治疗 …… (145)
第六节 基因治疗潜在的危险 …… (145)
第七章 唾液蛋白分泌的分子调节 …… (147)
第一节 典型的唾液腺基因的结构和表达 …… (148)
一、激肽释放酶 …… (148)
二、血管紧张肽酶原 …… (149)
三、半胱氨酸蛋白酶抑制剂 …… (149)
四、富脯蛋白 …… (150)
五、富谷蛋白 …… (150)

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

六、富酪蛋白 …………………………………………………………………… (150)
七、富组蛋白 …………………………………………………………………… (152)
八、点蛋白 ……………………………………………………………………… (154)
九、α－淀粉酶 ………………………………………………………………… (154)
十、腮腺分泌蛋白 ……………………………………………………………… (155)
第二节　唾液基因表达的调节 ……………………………………………… (155)
一、发育期唾液蛋白基因的调节 …………………………………………… (155)
二、胞外刺激时唾液蛋白基因的调节 ……………………………………… (156)
第八章　细胞粘附分子的分子生物学 ………………………………………… (159)
第一节　细胞粘附分子的基本特征 ………………………………………… (159)
一、整合素家族 ……………………………………………………………… (159)
二、选择素家族 ……………………………………………………………… (168)
三、免疫球蛋白超家族 ……………………………………………………… (169)
四、钙粘附素家族 …………………………………………………………… (171)
五、CD44 ……………………………………………………………………… (172)
六、细胞外基质分子 ………………………………………………………… (174)
第二节　炎症和免疫反应中的细胞粘附分子 ……………………………… (181)
一、生物反应修饰剂对细胞粘附分子的调节 ……………………………… (182)
二、细胞粘附分子信号传递功能 …………………………………………… (184)
三、炎症和免疫反应中细胞粘附分子的功能 ……………………………… (184)
第三节　口腔疾病与细胞粘附分子 ………………………………………… (186)
一、炎症性关节疾病中细胞粘附分子的作用 ……………………………… (186)
二、牙周组织疾病中细胞粘附分子的作用 ………………………………… (186)
三、整合素在口腔癌中的作用 ……………………………………………… (187)
四、粘附分子和口腔大疱性疾病 …………………………………………… (188)
第九章　细胞角蛋白与口腔疾病 ……………………………………………… (191)
第一节　细胞角蛋白的基本特征 …………………………………………… (191)
一、细胞角蛋白的分类和结构 ……………………………………………… (191)
二、细胞角蛋白的基因结构及其表达调控 ………………………………… (193)
第二节　细胞角蛋白的表达部位及其抗体 ………………………………… (195)
一、细胞角蛋白的表达部位、抗体及其影响因素 ………………………… (195)
二、口腔粘膜上皮的角蛋白表达 …………………………………………… (200)
汉英词汇索引 ………………………………………………………………… (204)

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第一章 概 论

第一节 分子医学的兴起与发展

目前,分子生物学(molecular biology)或称分子细胞生物学(molecular cell biology)是描述包括传统的生物化学、细胞超微结构与生理学(细胞生物学)和遗传学在内的新的学科领域。虽然其学科领域更加广泛,但更强调分子遗传学及发育信号的研究。前者包括遗传信息的转录、翻译及翻译后的修饰等,后者则指象生长因子这样的发育信号及其与组织发生有关分子信号的作用与相互作用。尽管许多分子生物学的技术来源于传统的生物化学技术,同时也包含判定大分子所涉及到的免疫学技术,但是,分子生物学中更为特殊的技术涉及到 DNA 与 RNA 技术,尤其是涉及到克隆这些分子到宿主细胞中的技术。

分子医学(molecular medicine)则指应用分子生物学等相关的生命科学的技术和手段,从分子水平研究人类疾病的病因、病理过程、临床诊断、临床治疗、转归与防治的一门学科。由于医学本身即是属于生命科学的范畴,因此,生命科学,特别是分子生物学的兴起和发展,与医学的研究和发展存在着千丝万缕的联系,它们密切相关、相互促进,很难确切地将分子医学的发展与其他生命学科截然分割开来。目前,分子医学主要的应用范围包括医学遗传学、新生儿疾病、医学微生物学、医学肿瘤学、治疗学、法医学等传统学科。但是,分子医学一词的提法却是 80 年代末、90 年代初随着分子生物学技术的普及和推广而产生的。在这一时期出版了几部以分子医学为题的教科书。其中的典型代表是 R.J.Trent 等编著的《Molecular Medicine: An Introductory Text》。该书在短短的三四年时间里即反复再版,从一个侧面反应了分子医学的普及速度。

表 1-1 列出了一些与分子医学的发展密切相关,获得诺贝尔生理医学奖的一些成果。可以认为,每一项取得的成果,都是分子医学发展的里程碑。

1988 年美国能源部和国立卫生研究院(NIH)发起了人类基因组计划。该计划是一个多学科、跨国性的研究计划。其最终目标是在 2005 年前测定和克隆整个人类基因组和一些模型微生物的 DNA 序列。实施此计划所取得的成果,将会产生无与伦比的科学与社会价值。至 2000 年 6~7 月间,经世界各国科学家共同努力,已完成了人类基因组草图的绘制工作,其中,中国的科研工作人员完成了整个计划的 1%的工作任务。

人类基因组计划的两个基本部分是遗传和物理图谱的制作。这两大策略都由 80 年代和 90 年代的主要技术的发展而促进。遗传性图谱的制作是间接地通过家谱和 DNA 多态性研究,确定染色体之间的距离。微卫星体多态标记技术使遗传性图谱的制作得以迅速地发展。物理图谱能更好地直接测量实际距离,其制作方法包括脉冲场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis, PFGE),酵母菌人工染色体(yeast artificial chromosomes, YACs)及荧光原位杂交技术(fluorescence in situ hybridisation, FISH)。这些技术能确定更长的 DNA 片段及其相互位置。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

表 1-1　主要的分子医学成果及其诺贝尔奖获得者

获奖年份	获奖者	主要成果
1959	S Ochoa, A Kornberg	体外合成核酸
1962	JD Watson, FHC Crick, MHF Wilkins	DNA 双螺旋结构理论
1975	D Baltimore, HM Temin, R Dulbecco	逆转录酶与致肿瘤病毒
1978	W Arber, D Nathans, HD Smith	限制性核酸内切酶
1980	P Berg, W Gilbert, F Sanger	构建第一个重组 DNA 分子并建立 DNA 测序技术
1989	JM Bishop, HE Varmus	癌基因的发现
1989	S Altman, TR Cech	RNA 与核酸酶
1993	R Boberts, P Sharp	基因拼接
1993	K Mullis, M Smith	聚合酶链反应与定点诱变
1995	E Lewis, C Nusslein-Folhard, E Wieschaus Wishos	早期胚胎发育的遗传机制

人类基因组计划的另一基本部分是资讯科技(informatics)。即实施此计划获取的数据可以被储存并被转送,从而使这些成果以尽可能快的速度得以传播和普及。资讯科技的主体成分是计算机网络与数据库。国际互联网与局部的服务商可以将这些成果尽快传播。资源中心与数据库的发展使新的信息得以储存和处理。

第二节　口腔分子生物学的发展与成果

如上所述,在过去近 30 年里,生命科学领域取得了革命性的进步,而这种进步的首要推动力来自分子生物学的兴起和发展。从 1944 年 Avery 等确立 DNA 是遗传的载体,到 1953 年 Waston 和 Crick 创立 DNA 分子双螺旋结构模型;从 1963 年 Nirenberg 等破译遗传密码,到 Baltimore、Nathans 和 Smith 发现逆转录现象和限制性内切酶,到近年来 Anderson、Blaise 和 Rosenberg 等率先开展的人体基因治疗,以及人体基因组计划的实施,无一不使人们对生命现象的认识产生一次次飞跃。既属生命科学范畴,又具有独自特性的现代口腔医学,借助分子生物学的发展,也逐渐进入生命科学发展的时代,并且逐渐形成了自己的新的学科分支——口腔分子生物学。尽管在 1991 年,Ferguson 编著了一本论文集《Aspects of oral molecular biology》,但是至今尚无人对口腔分子生物学下一个明确的学术定义。顾名思义,口腔分子生物学是应用分子生物学的技术和手段,在分子水平,对人类牙、颌、面组织器官的正常生长、发育和衰老过程,以及牙、颌、面疾病的病因、病理、临床诊断、治疗、转归预测和防治进行研究的学科。目前,口腔分子生物学的应用和发展已经并且正在极大地推动着口腔医学的进一步发展。

一、龋病替代疗法

龋病是人类口腔中最常见的疾病,它被世界卫生组织列为威胁人类健康的第三大疾病,因而被作为重点防治对象。所谓龋病替代疗法是指采用一定技术手段从致龋菌获得无毒的突变菌株,将这种突变菌接种于口腔内龋病好发部位,以占据有毒的野生型致龋菌株聚集的位置,

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

从而预防和治疗龋病。龋病替代疗法为口腔分子生物学的重要研究成果。由于这种防治方式具有可伴随宿主终身，而且又会在宿主之间自动传播的特点，因而倍具吸引力。几十年来的研究表明，变形链球菌是首要的致龋菌。因此，人们先后采用紫外线、X 射线、快速中子以及化学诱变剂等手段诱发其突变，并成功地筛选出了乳酸脱氢酶缺陷突变株。这种突变株接种于动物口腔后，不仅仍可定居于动物口腔之中，而且，即使饲以高糖致龋食物，接种动物发生的龋病也较对照组少得多，从而证实了替代疗法的可行性。但是，这些传统诱变方法诱发的突变株常有回复率较高、突变菌株产量小、不适于大规模群体接种等缺点。因此，人们开始着眼从基因水平改造变形链球菌。

Pucci 等首先采用分子克隆技术克隆出了变形链球菌的致病基因——葡萄糖基转移酶(glucosyltransferase，GTF)基因(gtf)。继之，在体外对该基因进行人工修饰，使其出现遗传缺陷后，重新引入野生型变形链球菌体内，获得了较稳定的不产生致龋物质的突变菌株，在动物体内也得到了明显的防龋效果。尽管这项成果的实际应用可能还有一段时间，但 Pucci 的工作至少说明：利用分子生物学手段改造致龋菌，无论在理论上还是在实践中，均可能是行之有效的一条防龋研究新途径。

二、基因工程防龋疫苗

除替代疗法从改造致龋菌入手外，诱导机体自动免疫，干扰致龋菌在牙面的早期粘附与聚集，阻断致龋微环境的形成等，也一直是人们寻求的另一防龋途径。早期的研究是从致病菌如变形链球菌获得全菌或菌体蛋白成分后，免疫机体获得防龋抗体。但不幸的是，由于经这些途径获得的抗原成分不纯，刺激机体产生相应的抗体与心肌组织之间存在着严重的交叉反应。

近年来，由于利用基因工程手段可以获得高纯度的蛋白质产物，因此，人们又开始着眼于基因工程防龋疫苗的研究。现在，国外几家实验室已经通过基因克隆技术，获得了约 30 种致龋基因片段。其中，较为重要的有编码变形链球菌 GTF 的 gtf 基因；编码变形链球菌表面蛋白抗原的 SpaA、Spapl 基因等。这些基因片段的克隆成功，不仅为进一步从分子结构上研究致龋菌的致病特性打下了基础，而且为利用基因工程生产防龋疫苗作好了必要准备。Curtisse 等人将 SpaA 重组质粒表达于鼠伤寒沙门菌中，用该菌系免疫小鼠后，该菌在鼠内脏中获得了持久性定居能力，并不断刺激机体在体液(包括唾液)中产生了 IgA 防龋抗体。这种高特异性基因工程疫苗诱导产生的高效抗体，有效地抑制了变形链球菌对牙面的粘附，而对心肌组织无交叉反应。

口腔分子生物学的应用，将为人类提供高纯度的防龋疫苗，且这类基因工程疫苗可望成为今后防龋的有效制剂。

三、颌面部发育的基因调控

传统口腔修复材料与人体组织在物理性质、化学结构、生物相容性等方面都还存在着差异。在一些口腔硬组织疾病的病因未完全明了以前，新型生物活性材料的出现是临床口腔医学对这些疾病的诊治水平取得突破的首要条件。而对颌面部发育调控基因的逐步认识，为研制新型生物活性口腔修复材料作好了理论准备。

现在，通过分子生物学理论和技术，已逐步了解到控制颌面部发育的结构基因和调节基因，尤其是与牙体组织发育相关的基因，如牙釉质蛋白相关基因、牙本质磷酸蛋白基因等。假

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

如这些基因被分离克隆及表达成功，那么，临床口腔医师将利用盼望已久的，与正常口腔组织在生物、物理、化学特性等方面完全一致的基因工程材料，为患者解除病痛。

四、口腔微生物种型鉴定

牙周组织疾病是影响人类口腔健康的另一大类疾病，其病原微生物致病学说已得到公认。近年来了解到，牙周疾病的发展有一个缓解——活跃——缓解的周期性变化过程，而只有活跃期牙周病才具有临床治疗意义。但是，如何判定牙周疾病的活跃期，一直是临床牙周病学界关注的问题。比较成功的传统方法是进行牙周微生物的厌氧分离培养，并且已经确立了一些微生物如放线共生放线杆菌、牙龈卟啉单胞菌及中间普氏菌等的数量与牙周病的活跃期密切相关。由于牙周病的相关菌主要为厌氧菌，从临床取标本进行厌氧分离培养的影响因素又多，因此，采用常规的分离、培养，鉴定较为困难。

近年来较多学者对制备特异、敏感的核酸探针作了有益的尝试。DNA 探针的应用结果表明，放线共生放线杆菌、牙龈卟啉单胞菌、中间普氏菌等菌群的检出量超过 10^5 就极有可能是牙周病的活跃期。与细菌培养对照研究发现，DNA 探针的灵敏度、临床病情吻合度优于细菌分离培养，且特异、快速。因此，DNA 探针已经开始试用于口腔临床。

五、口腔粘膜病病原因子的认识与修正

口腔分子生物学有助于确立或修正对口腔疾病病原因子的认识，最成功的实例当属口腔粘膜毛状白斑(oral hairy leukoplakia，OHL)病因的确定与修正。1984 年 Greenspan 在研究艾滋病患者的口腔表征时，发现了一种新的疾病。这种病损出现在舌侧缘，呈白色，表面为绒毛样，因不能用以往已认识的任何疾病加以诊断，他将其命名为 OHL。电镜病理观察发现，OHL 病损组织中有较典型的病毒感染征象，电镜观察又发现有大量的病毒颗粒，免疫组织化学染色显示 70% 以上标本中人类乳头状瘤病毒(HPV)抗原阳性，因此，初期认为 OHL 的病因是 HPV。但进一步用对 HPV 特异的 DNA 探针进行 Southern 印迹杂交及组织切片原位杂交，均未找到 HPV 存在的证据，而免疫荧光却发现有 EB 病毒衣壳抗原的阳性反应，进一步采用对 EB 病毒特异的 pBgl2U DNA 探针进行 Southern 杂交及组织原位杂交，均显示了 EB 病毒存在的证据，从而修正了认识，使 EB 病毒是 OHL 病原因子的学说得以公认。

六、口腔癌的早期诊断与治疗

新近的调查结果表明，每年美国有 40 000 人、其他国家有 350 000 人患有口腔肿瘤。在普通人群中，口腔癌在最常见的癌症中居第 6 位，在发展中国家居第三位。约半数的患者将于诊断后 5 年内死亡，而存活的患者将出现美学及功能的缺陷。应用分子生物学技术于口腔癌的早期检测和(或)治疗，对较大地降低其死亡率和发生率都具有重要作用。

现已发现，口腔肿瘤的引发和进展可能与原癌基因突变并获得功能有关。原癌基因的产物大多为具有生长调控作用的蛋白类物质，可干预细胞生长信号调节途径中的某个环节。并且原癌基因在一定条件下可被激活，激活后的原癌基因成为细胞癌基因，其异常表达可导致细胞增殖、生长和分化的失控，进而形成肿瘤。其中原癌基因上皮生长因子受体(EGFR)/c－erb B1，ras 基因家族成员被认为与口腔上皮癌的发生具有密切关系；此外，c－myc，cint－2，hst－1，PRAD－1 和 bcl－1 的非正常表达也被认为在口腔癌的发展中起了很大的作用。已报道在

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

DMBA 诱导的金黄地鼠颊囊恶性口腔癌模型中,有细胞癌基因 c－erb B1 的过度表达和扩增。也有作者发现转化生长因子 α(TGF－α)在人类口腔癌和金黄地鼠口腔肿瘤中的表达异常,并认为 TGF－α 促进了新的血管化和有丝分裂。

除上述癌基因外,与口腔癌发展有关的癌基因还有:hst－1,int－2,bcl－1,sea,men－1,ems－1。

研究发现,仅有癌基因的激活还不足以引起口腔癌,但癌基因是该过程的重要引发因素。在癌前细胞向恶性细胞转化的过程中,关键的环节是细胞负性调节因子,即肿瘤抑制基因的失活。肿瘤抑制基因是正常细胞基因组的组成部分,具有与原癌基因相拮抗的作用,能抑制肿瘤的形成和生长,故又称为抑癌基因。现已分离鉴定出 12 种以上的抑癌基因,抑癌基因可出现缺失、突变而失活,失去其负向调节细胞生长分化的能力。正是由于对细胞生长的正负调节机制失去平衡,才造成了细胞的无限增殖和生长,使口腔角质细胞的恶性转化,即肿瘤抑制基因功能的丧失这一重要事件难于完成。这可部分解释成年人实体性肿瘤如口腔癌的形成所需的时间较长。到目前为止,只发现少数基因如 p53,doc－1 和凝血酶反应素 1 在恶性口腔角质细胞中表现出肿瘤抑制基因的活性。

七、口腔疾病的基因治疗

基因治疗即将正常基因片段插入细胞或有机体,从而修正遗传性缺陷。

对一些遗传性口腔疾病以及非遗传性口腔疾病的分子机制的认识,已为试用基因治疗作了一定的准备。因牛、鼠的牙釉质基因体外克隆已成功,以此作为探针已在人染色体上定位了人牙釉质基因,若人牙釉质基因克隆成功,将为牙釉质发育不全症患者带来希望。牙釉质发育不全症是由于造釉蛋白发育不全而导致的牙体缺陷性疾病,表现为牙釉质缺损或根本没有牙釉质覆盖。在美国,约 14 000 人中就有 1 名牙釉质发育不全症患者。该症目前尚无满意的治疗方法,基因疗法可能是从根本上有效治疗该症的手段。

对调控牙体组织疾病发生基因的研究,亦有利于人为改造牙体外形,增强牙体组织的抗龋能力。在牙体组织表面有龋病较强的好发部位,因为在牙体表面存在一些天然发育缺陷区域,为致龋菌提供了栖身的场所。假如认识了牙体发育的基因调控程序,并从分子水平加以修饰,消除这些发育缺陷区,龋病的防治则可望取得重大突破。

第三节　我国口腔分子生物学的发展

近年来,随着口腔分子生物学的兴起与发展,大量的分子生物学手段亦被我国科学家广泛应用于口腔疾病的病因、发病机制、临床诊断、预后转归与预防等研究中。这些手段和技术的应用极大地推动了我国口腔医学事业的发展。使我们对有些口腔疾病,特别是对部分常见病、多发病的认识提高到一个全新的高度。

一、原癌基因与头颈部肿瘤

目前我国对原癌基因与头颈部肿瘤关系的研究多为 ras 癌基因家族、myc 癌基因家族和 erb B 癌基因。

有学者应用 DNA 斑点杂交技术,检测 21 例口腔鳞癌中 c－H－ras 基因,发现无扩增现象,

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

认为口腔鳞癌中 H－ras 基因的激活不是以基因扩增的形式，可能是通过突变、过量表达的形式发挥作用。另有学者应用 DNA 探针，检测涎腺肿瘤中 H－ras mRNA 表达水平，发现 5 例腺样囊性癌和 2 例腺癌中均有 H－ras 和 Ki－ras mRNA 的高表达，提示 ras 癌基因的高表达使该肿瘤获得了一般低度恶性肿瘤所不具有的较强的浸润性和转移性。

有学者采用 c－myc 探针，对 28 例口腔鳞癌中 c－myc 基因进行 DNA 斑点杂交，发现 12 例标本中出现 c－myc 扩增，1 例出现重排，异常率为 46.5%。因 c－myc 的扩增与 TNM 分期有关，故认为 c－myc 有可能作为口腔鳞癌预后的指标之一。有学者应用^{32}P 标记的 c－myc 探针，检测 4 例口腔颌面部恶性肿瘤细胞系，发现在腺样囊性癌 SACC 及粘液表皮样癌MEC－1细胞系中均存在 c－myc 扩增，而在舌癌及牙龈癌中则未见扩增。有研究发现 7 例鳞癌中 2 例 c－myc mRNA 表达明显升高，3 例轻度升高，1 例低分化癌与口腔癌的发生有密切关系。但由于例数有限，该基因扩增、异常表达与肿瘤恶性程度、转移及预后的关系还有待进一步研究。

另一项研究采用 DNA 斑点杂交方法，检测 35 例腮腺多形性腺瘤和 36 例恶性多形性腺瘤中 c－erb B2 扩增情况，发现 17.1%的多形性腺瘤(6/35)及 61.1%(22/36)的恶性多形性腺瘤有 c－erb B2 的扩增，两组有显著差异。c－erb B2 的扩增与恶性多形性腺瘤临床分期无明显关系，但与肿瘤的分化程度与预后有关，提示 c－erb B2 可作为恶性多形性腺瘤的预后指标。

我国的研究发现，与头颈部肿瘤密切相关的抑癌基因有 p53、Rb 和 nm23 基因。

我们曾应用聚合酶链反应－单链构象多态性检测，在口腔鳞癌中发现了 p53 基因点突变，并采用野生型 p53 基因转移进入具有 p53 基因突变的口腔鳞癌细胞株，能部分地促进鳞癌细胞株分化，降低其生长能力及在裸鼠体内的成瘤性，降低其生长活性。因此认为 p53 基因在口腔鳞癌的发生、发展及转移过程中可能具有一定作用。

另有学者应用地高辛标记 Rb cDNA 探针，对口腔鳞癌组织 DNA 进行 Southern 杂交，发现 28 例口腔鳞癌中 6 例出现 Rb 基因缺失，1 例重排，分别占标本的 21.4%和 3.6%，而正常口腔粘膜的 Rb 基因正常。Rb 基因在口腔鳞癌中的异常率低于 p53 基因。最近我们又发现头颈部鳞癌中常出现细胞周期素 D1 基因的扩增，因细胞周期素 D 受 Rb 的磷酸化和非磷酸化调节，故认为头颈部鳞癌的癌变过程与由细胞周期素 D、Rb 基因和 p16 组成的细胞周期调控系统失控有关。Rb 基因在头颈部肿瘤中所起的作用还有待进一步研究。

应用 mRNA 斑点杂交技术，研究 52 例颊癌及相关组织中 nm23－H1 和 nm23－H2 mRNA的表达，发现颊癌有淋巴结转移组中 nm23－H1 mRNA 的表达比无转移组明显降低，且转移灶中 nm23－H1 mRNA 的表达更低。11 例有淋巴结转移颊癌中 9 例(81.8%)为 nm23－H1 低表达，而 19 例无淋巴结转移颊癌中 15 例(78.9%)为高表达。nm23－H2 mRNA 的表达在肿瘤有无淋巴结转移患者中无明显差异。作者认为 nm23 mRNA 的表达可作为预测颊癌有无淋巴结转移的一个有价值的指标。有研究者对 40 例涎腺恶性肿瘤的 nm23 表达水平进行检测，发现 nm23 低表达者的肿瘤淋巴结转移率为 81.8%，而 nm23 高表达者的肿瘤转移率只有 3.4%，证实 nm23 基因在抑制涎腺恶性肿瘤转移方面起重要作用。

口腔粘膜下纤维性变(OSF)被认为是一种癌前损害。我国湖南省、台湾省等地居民有嚼槟榔习惯，此病较为流行。采用原位杂交方法检测 OSF 患者及正常人口腔粘膜，发现转化生长因子－β1(TGF－β1)在组织角朊细胞中表达，作者推测 TGF－β1 可能作为一种中间介质参与了 OSF 的发病过程。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

二、牙周组织疾病的分子机制

在牙周炎发病过程中，机体的免疫防御反应始终发挥着极其重要的作用。我国学者应用逆转录－聚合酶链反应，发现牙周炎组织中白细胞介素－1α(IL－1α)有较显著的表达，作者推测 IL－1α 是牙周炎较特异的细胞因子，参与了牙周炎时致病过程。

将白细胞介素－1β(IL－1β)加入体外培养的人牙周膜成纤维细胞(HPLF)中。结果发现，经 IL－1β 作用后，HPLF 的碱性磷酸酶表达明显减弱，提示在牙周病病灶中，IL－1β 可能不利于硬组织的形成和骨性愈合。

采用斑点杂交法证实，多聚腺嘌呤二磷酸核糖合成酶(PADPR)调节因子通过抑制 PADPR 的活性，促进了牙周膜成纤维细胞 α1(Ⅰ)和 α1(Ⅳ)胶原基因的表达。这一结果为牙周组织再生的研究提供了新的方向。

另有学者发现，采用放线共生放线杆菌、牙龈卟啉单胞菌全染色体探针，能较特异地检测微量标本中待测菌的存在。采用牙龈卟啉单胞菌菌毛基因 5 端 542 bp DNA 探针， 可检测出 0.5 pg DNA 标本中同源序列，该探针具有较好的特异性。

三、致龋菌毒力因子及基因工程防龋疫苗

在变形链球菌致龋过程中，变形链球菌的表面蛋白Ⅰ/Ⅱ(或称 Pac)与葡糖基转移酶(Gtase)，在介导变形链球菌粘附过程中发挥主要作用。同时，表面蛋白Ⅰ/Ⅱ与 Gtase 本身具有良好的免疫原性，是防龋疫苗研究中的主要候选免疫原。

通过等位基因交换，所获得的变形链球菌 Gtase－Ⅰ、Gtase－Ⅱ缺陷株丧失了蔗糖依赖性粘附能力。这种粘附能力的丧失与葡聚糖合成减少而导致的变形链球菌粘附结构的变化相关。

有学者通过遗传工程手段，首次获得了变形链球菌 Gtase－Ⅰ的高表达。进一步研究发现，当 Gtase－Ⅰ高表达株合成过量葡聚糖时，细菌的粘附结构发生改变，变形链球菌的粘附能力反而下降。这一结果首次提示，虽然葡聚糖在变形链球菌的粘附过程中是必不可少的，然而当存在过量的葡聚糖时，可能通过干扰变形链球菌的有效粘附结构而使细菌的粘附能力下降。

另一些研究集中于变形链球菌的表面蛋白 Pac 上。利用变形链球菌—乳链球菌穿梭质粒，将变形链球菌的表面蛋白Ⅰ/Ⅱ基因转入乳链球菌，成功获得表达。其表达量约为变形链球菌的 1/6。

将该重组乳链球菌免疫小鼠，结果发现小鼠血清中抗 Pac 抗体显著升高。将重组乳链球菌免疫孕兔，兔乳汁中特异性抗 Pac 抗体显著升高，该免疫乳汁能有效干扰变形链球菌的粘附。以上这些研究为进一步的免疫防龋研究与应用打下了坚实的基础。

第四节　我国口腔分子生物学进一步发展的策略

虽然口腔分子生物学在我国的兴起和应用时间不长，但它的迅速普及与手段的多样化，已将我国口腔医学研究推进到一个新的水平，并已取得了初步成果。但也应该看到，与其他生命科学相比，其进步仍较缓慢。为此，除传统的走出去、请进来的学习方式外，应立足于我国国内分子生物学已取得的成就，同时可考虑从以下几方面开展工作，以促进分子生物学在现代口腔

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

医学教学、医疗和科研工作等方面的渗透和普及，从而促进口腔分子生物学的进一步发展。

首先，重视毕业后教育，定期对临床口腔医师进行基础培训，使他们对相关的分子生物学技术的基本概念、基本方法，以及前沿发展有一概括的了解。

其次，对口腔医学高年级本科生及研究生，增设结合口腔医学实际的分子生物学专题讲座，使他们成为口腔分子生物学应用与发展的开拓者。

再次，加强口腔临床医师与医学分子生物学研究者的合作，可采取共同进行课题研究，邀请基础研究者参与疾病发病机制与诊断的研讨等形式，促进临床医师与基础研究者在思维上、学术上的交流。

此外，建立一套合理的人才流动体制，鼓励一部分有一定临床经验的专家到分子生物学研究室工作 2～5 年后，再回到口腔临床，使他们对分子生物学的理论有较深入的认识，并掌握其技术，成为沟通基础医学和临床医学的桥梁。

总之，尽管口腔分子生物学理论和技术，在口腔医学临床实际应用中还会遇到各种困难，相信在不远的将来，无论在口腔疾病的病因、发病机制、病情监测及防治等方面，有关的新理论和技术将会起到举足轻重的作用。

（陈谦明）

参考文献

1 Trent RJ. Molecular Medicine: An Introductory Text. 2ed, New York: Churchill Livingstone, 1997

2 Fergson DB(ed). Aspects of oral molecular biology. Front Oral Physiology, 1 ed, Basel: Karger, 1991

3 Loe H. Teeth for life: oral disease prevention in research and practice. Int Dent J 1990,40:74

4 Dabelsteen E, Clausen H: Molecular biology in oral research. Scand J Dent Res, 1992,100: 3

5 Sofaer JA. Dentistry and the new genetics. Bri Dent J, 1989,23: 209

6 陈谦明，傅继梁，李秉琦.分子生物学与口腔医学的现状和未来.中华口腔医学杂志，1995,30(2):120

7 陈谦明，李秉琦.分子生物学与口腔粘膜疾病.实用口腔医学杂志，1995,11(4):295

8 边专，樊明文.分子生物学技术在口腔医学中的应用，中国口腔医学年鉴，第八卷.四川成都：四川科学技术出版社，1999 年.64

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第二章　常用分子技术

第一节　脱氧核糖核酸及核糖核酸

脱氧核糖核酸(DNA),是包含有生物遗传信息的双链大分子,主要分布在细胞核中,分子内含有四种脱氧核苷酸,是生物遗传变异的物质基础。核糖核酸(RNA),主要存在于细胞质中,细胞核中也存在一部分,是含四种核糖核苷酸的长链,主要包括核蛋白体 RNA(rRNA)、转运 RNA(tRNA)和信使 RNA(mRNA)三类。

一、DNA 的来源

DNA 在实验室中具有许多可被利用的特性。如果要得到待研究的 DNA 分子,需要有核细胞、消化细胞膜和蛋白的酶,以及将核酸与蛋白质分离的化学试剂。实验室中常见到如下步骤:获得组织标本后,首先用酶将核酸从细胞碎片中分离,然后再用化学试剂如酚和氯仿把蛋白质和 DNA 分离。在某一特定的生物体中,所有细胞的 DNA 序列是相同的。因此,欲获得组织 DNA 用于研究,相对来说是较为容易的,10 ml 血就可以分离到多达 250 微克的 DNA,这足以开展一般的实验研究。在常规的基因诊断中使用的 DNA,可以从口腔漱口液或发根的表面脱落细胞中直接获取。

二、DNA 的结构与功能

采用分子技术发现,DNA 的结构有两个特性,且二者密切相关。第一是遗传密码以碱基三联体(密码子)的形式存在(表 2－1),也就是说每个多肽是由不同的三联体密码编码而成。例如肽链甘氨酸－丝氨酸—缬氨酸－丙氨酸－色氨酸的相应密码子即为－GGT－TCT－GTT－GCT－GCT－TCG。同样,一条肽链是什么位置开始和结束也是由三联体 ACT(开始)和 TAA、TAG、TGA(结束)决定。在所有遗传密码中的任何点突变(在核苷酸中单个碱基改变)都能导致遗传变异现象的出现。第二是由 2 条链构成(图 2－1)。每条链有一个从脱氧核糖 5′与到 3′碳原子连接成的脱氧核糖－磷酸骨架。一条链的末端或者是 5′磷酸基团(5′末端),或者是 3′磷酸基团(3′末端)。

DNA 的一条链(有意义链)在 5′到 3′方向上含有遗传信息,以四种核苷酸 A、T、G、C 形式存在,与它相对的链(反意义链)则有一相应的互补序列。例如,A 与 T 配对,G 与 C 配对,反之亦然。例如,对于以上描述的多肽链的双链 DNA 的序列是:

有意义链:5′－ATG(开始)－GGT－TCT－GTT－GCT－GCT－TGG－TAA(结束)－3′

反意义链:3′－TAC－CCA－AGA－CAA－CGA－CGA－ACC－ATT－5′

从生物学的角度来说,DNA 的双链结构对于使子代细胞复制到相同数量的双链 DNA 拷贝是十分重要的。以上述实例为例,遗传密码需要从有意义链读取,因而,特定的 mRNA 序列的转录是从反意义链上获取,从而使形成的 mRNA 单链反映有意义链的序列。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

三、RNA

在分子生物学应用中需注意，RNA和DNA结构的不同之处包括：RNA是单链，结构中由尿嘧啶(U)取代了胸腺嘧啶(T)，且RNA含核糖，DNA含脱氧核糖。在许多情况下，研究者研究的RNA主要是mRNA。与DNA的特性相比，RNA比较脆弱；在分离过程中，需要额外的化学试剂灭活RNA酶，以避免RNA降解。

RNA与DNA的另外一个重要的不同之处，是前者具有组织特异性。这样，相关的mRNA只能从一种组织中分离得到。该组织就靶蛋白来说具有转录活性。例如，网织红细胞是红细胞前体，它主要包含有红细胞系mRNA(如β珠蛋白基因mRNA)。该mRNA不适合用作神经类mRNA分析。直到现在，由于其组织特异性，mRNA的应用仍然受限。不过已经注意到mRNA产物也较易获得。

mRNA只含有必要的外显子的遗传信息，而没有内含子中的多余的信息。从重组DNA技术的角度来看，因mRNA分子要小得多，较DNA具有一定优势。

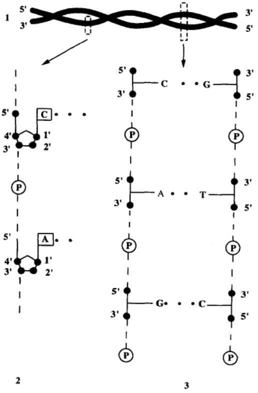


图2-1 DNA的结构模拟图

1. 为DNA双螺旋结构的线形模式图，两条互补的链(即A与T配对，C与G配对)持相反走向；有意义链为5′→3′，反意义链为3′→5′。2. 伸展的单链DNA示三种基本成分：碱基(C、A，未显示T、G)；二种含氮的碱基：嘌呤(A、G)和嘧啶(T、C)；脱氧核糖位于第5碳原子，走向1′→5′。P代表磷酸二酯，它连接二个脱氧核糖。3. 为伸展的双链DNA，两条链是由碱基之间的氢链(A/T间靠两个氢键，G/C间靠三个氢键)维系；转录的方向是5′→3′

四、cDNA

cDNA是指互补(有时称拷贝)DNA。在体内或体外实验过程中，细胞中DNA-RNA-蛋白的过程常被反转录现象所干扰。因此，研究者以mRNA为模板合成出与其互补的第二条链。这种形式的双链结构即称之为cDNA。与平常我们所称谓的基因组DNA不同，cDNA没有内含子而只有编码(外显子)的序列(图2-2)。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

表 2-1 遗传密码

第一个核苷酸[5′]	第二个核苷酸 T	C	A	G	第三个核苷酸[3′]
T	苯丙氨酸	丝氨酸	酪氨酸	半胱氨酸	T
T	苯丙氨酸	丝氨酸	酪氨酸	半胱氨酸	C
T	亮氨酸	丝氨酸	终止密码	终止密码	A
T	亮氨酸	丝氨酸	终止密码	色氨酸	G
C	亮氨酸	脯氨酸	组氨酸	精氨酸	T
C	亮氨酸	脯氨酸	组氨酸	精氨酸	C
C	亮氨酸	脯氨酸	谷氨酰胺	精氨酸	A
C	亮氨酸	脯氨酸	谷氨酰胺	精氨酸	G
A	异亮氨酸	苏氨酸	天冬酰胺	丝氨酸	T
A	异亮氨酸	苏氨酸	天冬酰胺	丝氨酸	C
A	异亮氨酸	苏氨酸	赖氨酸	丝氨酸	A
A	蛋氨酸	苏氨酸	赖氨酸	丝氨酸	G
G	缬氨酸	丙氨酸	天冬氨酸	甘氨酸	T
G	缬氨酸	丙氨酸	天冬氨酸	甘氨酸	C
G	缬氨酸	丙氨酸	谷氨酸	甘氨酸	A
G	缬氨酸	丙氨酸	谷氨酸	甘氨酸	G

表中显示 DNA 分子上的核苷酸三联体及其所对应的氨基酸(T:胸嘧啶,C:胞嘧啶,A:腺嘌呤,G:鸟嘌呤),在 mRNA 分子中,T 被 U(尿嘧啶)代替。每种氨基酸可能有一种以上的密码子,遗传密码应从左向右读

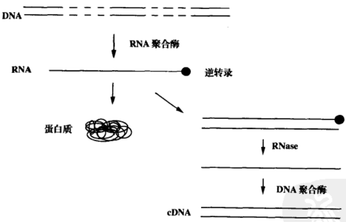


图 2-2 cDNA 的合成

双链 DNA(实线代表外显子,虚线代表内含子)被转录为 RNA(带●的实线),正常情况下,RNA 即被翻译为蛋白质。但是逆转录酶可合成一个拷贝的 cDNA(实线)。将 RNA 成分用核糖核酸酶除去后,在 DNA 聚合酶的作用下可以形成 cDNA 的第二条互补链。从最初的 DNA 模板合成的双链片段只含有外显子成分。利用上述原理的 PCR 方法常缩写为 RT-PCR(即逆转录 PCR)

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

五、DNA 探针

研究者利用 DNA 双链结构的特性来研究和制造探针(图 2-3)。探针实际上是一段单链的 DNA 片段,这部分片段能够通过互补的核酸序列与另一条相应的单链 DNA 结合。例如,如果单链有一目标序列为 5′-GGTTACTACGT-3′,则单链 DNA 探针应为 3′-CCAATGATGCA-5′。探针的特异性取决于它的核酸序列。由于双链 DNA 是通过氢链保持在一起,因而将探针 DNA 或靶 DNA 变成单链就比较容易。如通过煮沸或 NaOH 处理即可。一旦冷却或 pH 转为中性时,互补的 DNA 链会“再退火”,即重新通过碱基配对形成双链。此时,可形成三种形式的 DNA 双链:DNA 探针与 DNA 探针;靶 DNA 与靶 DNA;DNA 探针与靶 DNA。如果 DNA 探针用^{32}P 放射性标记,那么 DNA 探针和靶 DNA 杂交的部位与量,可通过放射自显影检测出来(图 2-4)。探针也能用非放射性的化合物标记(图 2-5),从而避免了放射性危害。后一种方法正在不断地改进,并日益受到人们的欢迎。

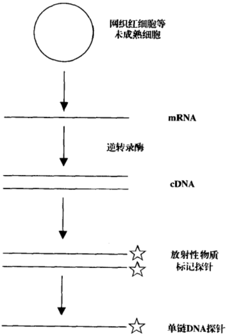


图 2-3 从 mRNA 合成 α 珠蛋白基因探针

DNA 探针有三种类型:cDNA、基因组和寡核苷酸。现在亦能够用质粒载体生产 RNA 探针。后者可以像 DNA 探针一样使用,或用于查明 RNA 的种类。DNA 探针曾有许多命名方法,易导致混淆。为此,国际核酸命名委员会确定了 DNA 探针的专门命名法。例如探针 D19S51 意思是人类 19 号染色体 51 区段。过去命名的探针 PTD3-21(P:质粒,TD:制备出探针的科学家 T Donlon)现在改命名为 D15S10。

第二节 DNA 定位图谱

DNA 图谱制作指的是一种专门技术,这种技术用来确定有关特殊基因或基因座位的限制性内切核酸酶识别位点。这种位点图谱将会因 DNA 重排而发生变化。DNA 图谱制作主要包括以下步骤:①DNA 制备;②限制性内切核酸酶酶切;③电泳;④Southern 转移;⑤DNA 探针杂交;⑥自显影。

一、限制性内切核酸酶

限制性内切核酸酶又称限制性内切酶,其唯一特性是具有识别特殊碱基序列的能力,通常为 4~6 个碱基序列。这一特性是 DNA 定位制图中的关键因素。对于任何 DNA 基因座位来

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

讲，都有许多可以被限制性内切酶识别的位点。被限制性内切酶消化产生的DNA片段将会组成此区域相应的图谱，称之为限制性内切酶图谱。该图谱可以代表一个或多个酶切片段。图谱的破裂，将意味着DNA序列的改变。当众多酶切位点中的一个位点发生变化时，说明存在着点突变等不连续的修饰异常影响了单核苷酸。这可能意味着基因序列的改变，或是中性碱基突变，导致DNA多态性，以后者的可能性更大。如果是多于一个酶切位点上发生改变，通常意味着结构重排的可能，例如发生了基因的缺失(图2-6)。

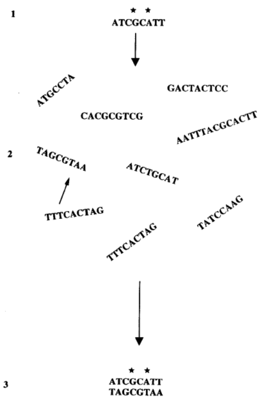


图2-4 利用探针判定特异的DNA片段

单链的DNA或RNA片段粘附于互补的单链DNA序列，探针的特异性取决于探针的核酸序列，核苷酸(如胸腺嘧啶)被放射性同位素标记(^{32}P，★)。1. 探针被制成单链；2. 靶DNA被限制性内切酶消化成小的片段并被制成单链，在此混合物中，与探针互补的序列(以→标识)按碱基配对原则配对；3. 放射性探针和靶DNA粘附于一起或称退火，非特异性粘附于基因组其他部位的探针，可以通过杂交后的洗涤步骤及用杂交(退火)条件抑制，采用高温及低盐方式将打破探针与其他DNA片段的非特异性连接

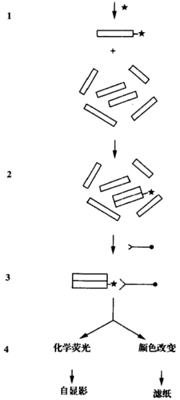


图2-5 非放射法标记DNA探针

1. 化学物质(☆)与DNA探针结合；2. 探针与互补DNA结合(杂交)；3. 运用相应的抗体检测化学物质；4. 用另外一种化学物质(●)标记抗体，这种化学物质在与第三种底物结合时可以产生一种颜色荧光

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

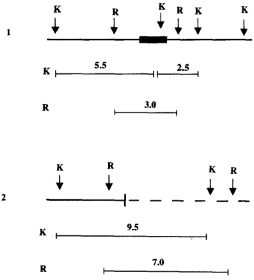


图 2-6　限制性内切酶图谱确定特异 DNA 位点的原理

限制性内切酶在 DNA 上识别其作用的特异性位点，DNA 序列的改变将打乱酶切位点，改变酶切片段图谱；小的改变，如象点突变，仅影响一个位置，大一点的改变，如象缺失，将影响更多的酶切位点；图中一个特异的 DNA 探针选出与基因(■)杂交，两种限制性内切酶(假定为 K 和 R)用于消化目标基因 DNA。1.用酶 K 产生 5.5 Kb 和 2.5 Kb 的带，而用酶 R 产生单独的 3.0 Kb 的带；2.任何此座位的重组，如象缺失(------)，将打破酶切图谱，因为大量的与缺失有关的 DNA 序列将产生不同的限制性内切酶识别位点，即酶 K 产生 9.5 Kb 的片段，酶 R 产生 7.0 Kb 的片段

常用的消化 DNA 的限制性内切酶通常是能够识别四个碱基对序列，但一些稀有的内切酶将会产生较大的 DNA 片段。DNA 被限制性内切酶消化后，DNA 将产生粘性末端或平末端。如果一个目标 DNA 片段将被克隆，那么粘性末端是特别有用的。如果胞嘧啶残基被甲基化，一些限制性内切酶将无法对 DNA 进行消化，因此可利用此特性鉴别甲基化与次甲基化的 DNA 片段。

二、Southern 分析

通过限制性内切酶消化产生的 DNA 片段，经琼脂糖凝胶电泳分离，进入不同的位置。后用氢氧化钠处理，DNA 片段将成为单链。单链 DNA 从琼脂糖上转移到一个更具活性的媒介上，例如尼龙膜，这一转移过程被称作 Southern 印迹。转移后的 DNA 可以用来与被^{32}P 或非放射性标记的 DNA 探针进行杂交，以研究有关问题。

在杂交过程中，可以通过以下步骤消除探针与膜及探针与不完全同源性序列的非特异杂交：①杂交前，使用另一种特殊 DNA(异源 DNA，例如鲑精 DNA)与膜进行预杂交；②杂交后，在严格的条件下(例如高温 65℃，低盐溶液)清洗杂交膜，彻底地冲洗可破坏随机互补碱基对之间偶然形成的氢键。最后即可检测到与标记探针特异结合的目标 DNA 片段。

在 DNA 图谱的制作过程中，其对照应包括：①在同一条件下处理的正常 DNA；②用来决定被杂交片段位置的 DNA 标准参照物。一个 DNA 图谱在能够被完全识读，常需要许多不同的限制性核酸内切酶消化。最大的 DNA 片段在 30～40 kb 之间；传统的 DNA 定位图一般可以检测到 100～200 碱基限制性片段的差别。

RNA 也可以被"绘图"。因限制性核酸内切酶只识别双链核苷酸，故在 RNA"绘图"过程中不用限制性内切酶。RNA"图谱"主要涉及到 RNA 长度的估算。人们很早就注意到 RNA 和 DNA 的另一个区别是：要求 RNA 必须来自具有转录活性的组织。RNA 的电泳也必须在变性凝胶上进行，以防止在电泳过程中形成二级结构。从变性凝胶上转移 RNA 至尼龙膜上的过程被称作"nothern"印迹。nothern 和 western 印迹，通常采用小写，因为他们不象 Southern 是由一个

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

人的名字命名。

特异性 RNA 可以通过使用放射性标记的 DNA 或 RNA 探针进行判定。可以通过被称为 S1 作图或 RNA 酶预防技术，对于低浓度的 mRNA 进行定性和定量。概要地讲，该技术主要是使 RNA 探针与 mRNA 一并“退火”，形成 RNA 探针与 mRNA 的杂交体，使 mRNA 对单链特异酶如 S1 核酸酶或 RNA 酶的抵抗性增加，从而提供了 mRNA 存在的间接证据。

第三节　DNA 扩增

从一段靶 DNA(或 RNA)产生、制造出大量相同区域的靶 DNA 的技术被称为 DNA 扩增。通常为达到这一目的使用的方法为聚合酶链反应(PCR，图 2-7)。DNA 扩增要求具有以下条件：①DNA(或 RNA)；②核苷酸引物；③*Taq* DNA 聚合酶；④四种核苷酸碱基的混合物；⑤温度循环设备。

一、PCR

PCR 是美国 Cetus 公司的 Kary Mullis 等建立的生物新技术，是在体外迅速地选择扩增特定的靶 DNA 序列的方法。能将小片段 DNA 快速扩增或复制数百万倍。

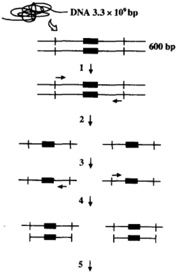


图 2-7　聚合酶链反应的原理

此例中，需要从 3.3×10^9 的人类基因组中扩增 600 bp 的 DNA 片段。第一步是设计引物于此 600 bp 片段的两侧，引物(→,←)实际是与靶序列两端 DNA 互补的单链 DNA 分子；2. 双链 DNA 分子通过加热形成单链 DNA 分子；3. 引物加入单链 DNA 并同时退火；4. DNA 聚合酶及四种核苷酸加入混合物，引物与第 4 步加入的试剂作用将产生一个拷贝的单链片段，最终产物是由引物所决定的双链 DNA 片段，此时，最初的单模板 DNA 已形成了两个拷贝，即已重复；5. 重复 2～4 将产生(理论上是 100% 效率)2^n 的模板 DNA(n 即循环次数)，如 20 次循环能将原始模板扩增 1×10^6 以上

PCR 使用了一种 DNA 延伸酶(聚合酶)，这种酶可以在合适的温度下，依据模板连接核苷酸碱基。在 PCR 中有三个基本步骤：①双链 DNA 变性成为单链 DNA 形式。②核苷酸引物结合于目的序列的两端。核苷酸引物是经特殊设计合成的，从而使它们能够与目的 DNA 或 RNA 序列互补，从而确定了 PCR 的特异性。核苷酸引物通常是过量存在于 PCR 体系中，从而保证不会随扩增步骤的消耗而影响 PCR 的进行。③加入四种核苷酸碱基和一种 DNA 聚合酶。目前多使用 *Taq* DNA 聚合酶，因为它具有相对较高的耐热性，在整个循环中不会因高温导致变性而影响聚合酶的活性。

一个 PCR 循环主要包括以上所说的三个步骤。经过一个循环之后，每一个单链 DNA 靶片段在 DNA 聚合酶作用下成为双链。继续循环下去，每一次循环将合成一条新的 DNA 靶片段。理论上讲，所产生的模板的数量等于 2^n(n 为循环次数)。如经过 20 次扩增循环，将会产生约 1×10^6 倍模板。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

可以采用许多方法来检测 DNA 扩增产物。最简单的方法是先利用电泳，再用溴化乙锭(EB)对 DNA 进行染色。EB 能够掺入核苷酸碱基，并在紫外光下发射荧光。放射性标记的核苷酸也可以掺入 PCR 产物，扩增产物就可以通过放射自显影技术进行检测。DNA 扩增产物也可以通过 Southern 印迹转移到尼龙膜，然后使用探针，通过杂交的方式进行检测。比色分析亦应用于 PCR 产物的检则，该方法要求核酸引物在经过修饰之后，允许被化学物质如生物素或荧光素标记。

PCR 具有极强的敏感性，因此即使是一个单细胞中的 DNA 也可以被扩增。

二、PCR 的不足

PCR 有两点不足。第一是在核苷酸引物合成之前需要有 DNA 序列，第二是在反应过程中容易发生污染。后者可能来自于其他 DNA 或其他样品或操作者，最常见的污染源是最初的扩增产物。这也是为什么 PCR 不能被用于一般常规诊断实验室的原因之一。现在已设计了许多防止污染的措施。

在评价 DNA 扩增的实用性的时候，扩增产物序列的忠实性是一个需要额外考虑的因素。因为在体外的 DNA 合成是一个易错配的过程，错配率与 *Taq* DNA 聚合酶的活性相比相对较低，据估计大约为 0.25%。也就是说，在 30 多个循环中，每 400 个碱基中有一个错配。最新生产的商业用的 *Taq* DNA 聚合酶，据称具有更低的错配率。

三、PCR 变异

在实际应用中，根据不同的研究目的，PCR 可以多种变异形式出现。多重 PCR 是指将各种引物混合，从而使多个扩增同时发生；巢式 PCR 是指用两套引物，第二套引物位于第一套的内部，这种途径可以增加 PCR 的灵敏度和特异性；RT－PCR(逆转录 PCR)用来扩增 RNA；长链 PCR，据其名可知，用来扩增长片段 PCR 产物。因为传统方式的 PCR 只能扩增相对较小的片段，一般为几百个碱基对，使用长链 PCR，可扩增的 DNA 长度范围为 5～40 kb(此点可以参见有关 PCR 的专著)，因而是一个很大的进步。

现在，研究者们正在不断地探索发现扩增 DNA 的改进方法，其中一种为连接酶链反应，使用这个方法，把合成的寡核苷酸“针缝”在一起，并连接到模板 DNA 上。因为没有单独的核苷酸碱基的参与，连接酶链反应即可消除错配的问题。

第四节　DNA 克隆

DNA 克隆是指利用载体和宿主系统，无限量地产生、纯化相同 DNA 片段的技术。DNA 克隆需具备以下条件：①一定特殊长度范围内的 DNA 片段；②能够接受被克隆 DNA 片段的载体；③一个允许载体和其插入 DNA 片段增殖的宿主系统；④从 DNA 文库中筛选目标克隆的方法。

一、策　略

克隆的第一步是决定需克隆的 DNA 分子的大小。如果所要寻找的基因很小(例如珠蛋白基因)，那么被克隆的 DNA 片段就较小。另一方面，如果试图克隆一个较大的基因(例如囊性

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

纤维化基因),或者发现染色体上某个位置的基因需要不同的方案,则需要一个最大可能克隆到 DNA 片段的方案。一旦长度明确之后,就可以选择合适的装载被克隆 DNA 片段的载体系统。使用物理方法随机切割或者用限制性核酸内切酶都可以将 DNA 分解为片段,靶 DNA 就可以从一个或几个这样的片段中筛选出来(图 2-8)。

二、克隆系统

(一)质粒载体克隆

质粒载体克隆为最简单的克隆系统。在这个系统中,DNA 和质粒被用同一限制性内切酶消化,并且尽可能地在每个末端产生不配对碱基(粘性末端),然后将两者的消化产物与 DNA 连接酶混合,使两者发生连接。这样,每一个 DNA 片段就被"缝"接到质粒上,在电流或氯化钙的作用之下,质粒与克隆 DNA 片段被 *E. coli* 大肠杆菌吸收(这个过程称作转化)。宿主 *E. coli* 分裂后,被接种在琼脂板上。如果操作正确,基因组中绝大部分的 DNA(包括靶 DNA)将被插入质粒,所获得的细菌即称一个 DNA 文库。以后的步骤主要是从这些 DNA 文库中浏览寻找出靶 DNA。所谓浏览寻找,首先需要放置一张尼龙膜紧贴琼脂平板,从而使细菌克隆被影印下来,影印到尼龙膜上的 DNA 之后被解成单链,然后使用合适的探针就可以寻找到靶 DNA。当发现膜上的阳性克隆后,再追溯至琼脂板上相应的细菌克隆并将其分离,用作克隆 DNA 的来源(图 2-9)。

(二)噬菌体载体克隆

噬菌体载体克隆是一种较复杂的、效率更高的克隆系统。噬菌体载体较质粒载体先进,能接受长片段 DNA 的插入。除了噬菌体和插入 DNA 片段在进入 *E. coli* 前要被转染进入一个转染单位(称作"包装")这一步外,其他步骤与质粒载体克隆均相同。琼脂板上的这些噬菌斑代表各自不同的克隆,使用噬菌体作为载体的缺点是靶 DNA 产量很低。其解决方法通常是在噬菌体文库中发现相应 DNA 后,再把 DNA 亚克隆到质粒载体。现在已经有许多商业性试剂盒,适合于克隆各种各样的噬菌体载体。

(三)酵母人工染色体载体克隆

如果克隆长 DNA 片段,则要求有更复杂的载体;粘粒、P1 菌体或酵母人工染色体(YACs)都适用于这一类克隆。后者带有适合于酵母的选择性标记,并且自动复制稳定的染色体。它们具有特殊价值,大片段 DNA(如 300~500 kb)都可以被克隆。DNA 和载体被插入一个真核(酵母)宿主(前面所述的克隆系统为原核细菌宿主),其主要优点是容许插入的 DNA 片段大,使靶 DNA 有可能在一个单独片段中被克隆。

克隆后的大片段沿染色体方向移动(染色体步移,chromosome walking)更加容易,这将在定点克隆中进一步讨论。为了分离基因,必须有一定的基因重叠,被称为"毗连"的相互重叠连接的 DNA 片段有助于染色体步移。毗连越大,那么"步移"越容易。必须强调的是,一些基因组的片段很难被克隆,噬菌体或粘性文库都难提供充足的毗连,此时,克隆到 YACs 的能力就非常有用。

制备 YACs 的技术要求较高,这种文库很难构建。为了方便实验,许多实验室已经成为提供这类载体的中心。携带比前面所述的还大的插入片段的 YAC 文库,也可以通过 CEPH(Centred Etude du Polymorphisme Humain,人类多态性研究中心,一个国际资源中心)得到。YAC 文库的筛选也很困难,但由于 PCR 的应用,已使其简化。最后需强调的是,插入到 YACs 的 DNA 片

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

段，特别是长一些的片段，经常是不稳定的，也就是说，它们可能重新重组，甚至消失。

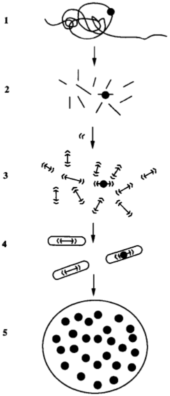


图 2－8　克隆的基本步骤

1. 靶 DNA 基因组为●；2. 用物理方法或内切酶将 DNA 随机分为许多片段，然后根据片段大小对其进行选择；3. 符合要求的 DNA 通过 DNA 连接酶被连接到 DNA 载体上，如：质粒、噬菌体，这样，许多 DNA 片段将会被连接，从而形成一个 DNA 文库，靶基因就很有可能被包含在此文库中；4. 载体和插入的 DNA 片段被转移到大肠杆菌（宿主），这个过程称为转化；5. 载体、插入子和大肠杆菌被置于琼脂平板上，每一个大肠杆菌形成一个独立的菌落。菌落用图 2－9 所示过程进行筛选，以确定含有目标 DNA 的克隆；阳性菌落进一步扩增，并提取和纯化目标 DNA 片段

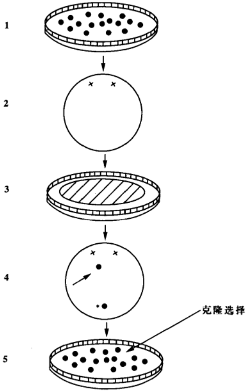


图 2－9　DNA 文库的筛选

1. 生长有大肠杆菌的琼脂糖主平板，每个 DNA 克隆的位置在此平板上表现为细胞克隆（质粒克隆）或噬菌体（噬菌斑）克隆；2. 用 × × 标记与主板形状和大小一致的尼龙膜相对于主板的方向；3. 将尼龙膜置于主板，部分克隆/噬菌体（含 DNA）将粘附于此膜；4. 由此膜获得的 DNA 被制成单链，并通过放射性标记探针寻找目标基因；5. →确定的膜上的阳性克隆/噬菌斑，★为阳性对照；6. 利用阳性克隆相对于 × × 标记的位置到原来的主板去选择所需的克隆或噬菌体

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第五节　DNA 测序

DNA 测序是指沿着直链 DNA 片段测量每一个核苷酸碱基对。测序需要:①克隆或扩增 DNA;②DNA 引物(核苷酸引物);③DNA 聚合酶;④四种核苷酸碱基(A,T,G,C);⑤四种双脱氧核苷酸碱基;⑥放射性或荧光素标记碱基;⑦通过电泳分离 DNA。

一、人工测序方法

大部分基因序列的紊乱是由于点突变造成的,少数是由不连续缺失造成。在这种情况下,如果突变、缺失或扩增不是位于核酸内切酶位点,单独使用 DNA 酶切图谱不可能检测到不正常基因,因此需要对不同的核苷酸碱基测序。

DNA 的测序方法及技术自 70 年代 Sanger Maxam 和 Gilbert 第一次发表后,已经被迅速推广应用。最初使用了两种方法,一种是应用化学裂解法,另一种更为常用,称为双脱氧链终止法。之后经历了许多种改进方案进一步提高完善了,例如,用^{35}S 而不是^{32}P 同位素标记;更加有效的多聚酶(测序酶)的分离;更好的凝胶电泳技术增大可读 DNA 序列的长度等(图 2-10)。

随着特殊噬菌体载体(M13),或包含 M13 复制起始位点质粒载体的发展,对克隆的单链 DNA 也可以进行测序了。在测序方面的另一进展是可以经过 PCR 进行序列分析,PCR 产生的单链或双链 DNA 都可以直接用以测序,而且这个方法目前已很完善。现在将可以用于 PCR 的测序方法称作“循环测序”。

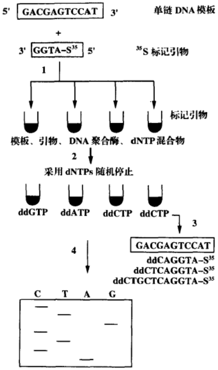


图 2-10　双脱氧链终止法测定 DNA 的序列

准备好单链 DNA 模板和用^{35}S 标记的引物(GGTA),两者被同时退火,并被平均分入四只试管。1.在有 DNA 聚合酶、四种脱氧核苷酸(dGTP、dATP、dTTP、dCTP)存在的情况下,自引物/模板双链位置出现链的延伸;2.在试管中加入双脱氧核苷酸(ddNTP)而随机终止延伸反应;3.如图所示,ddCTP 的试管中在含有胞嘧啶核苷酸处被随机终止形成大量长度不一的双链 DNA 分子,值得注意的是,含有 ddCTP 的片段与最初的模板序列互补,其余三种双脱氧核苷酸也发生了各自的反应,最终的结果是,产生了长度不一的、延伸的 DNA 双链;4.每一混合物在与相应的加有双脱氧核苷酸的泳道上(即 G 代表 ddGTP,余类推)通过凝胶电泳,DNA 序列由下向上阅读。图中的序列读为 ACTCGTC,此序列代表在 GGTA(引物)与其互补序列(CCAT)退火后产生的由 3'到 5'方向的 DNA 序列

二、自动测序方法

人工测序可以得到 200~400 碱基对可读 DNA 序列,自动测序则已经可以得到两倍以上人工测序数量的序列。目前所使用的仪器依赖于荧光素标记物的改进、PCR 和凝胶电泳(图 2-11)。在人类基因组工程进行的同时,相信将有可能产生更有效、更便宜的测序系统。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

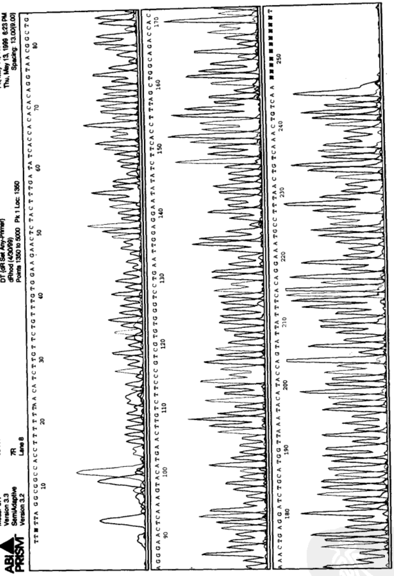


图 2-11　DNA 自动测序图

自动测序图需以彩色打印图显示，四种碱基以四种不同的颜色代表。在上图中显示为一例口腔鳞癌细胞患者鳞癌组织中抑癌基因 PTEN 外显子 7 的反义链测序结果，从中可看到 DNA 序列有不同的峰值，DNA 序列中的 N 自动测序装置不能够确定被测碱基属于哪一种碱基

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第六节　定位克隆

定位克隆是指在染色体定位的基础上分离和克隆基因，而不是依据其功能特性克隆基因。定位克隆要求：①染色体定位；②候选基因；③DNA 多态性；④基因图；⑤物理图谱；⑥基因“解码”。

一、功能性克隆

A 型血友病是功能性克隆的典型实例。在这个实例中，人们已经认识到该种疾病是由一种不正常末端产物（凝固蛋白因子Ⅷ）引起的。根据这一特点，相关基因就可以被克隆及绘图（图 2－12）。与传统途径完全不同的是，在这种克隆策略中，蛋白质完全被忽略，相关基因以其在基因组上的位置为基础而被克隆。

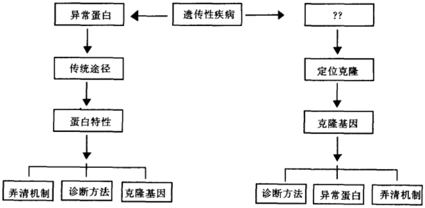


图 2－12　定位克隆与传统方法的比较

（一）染色体定位

定位克隆的第一步须得到一种可疑基因或染色体的线索。这通常来自于病例报告或观察，并且证实染色体重排的发生与临床某种征象有关。如被称为家族性多发性腺瘤（familial adenomatous polyposis，FAP）的家族性结肠癌基因的克隆即是如此。在一次遗传性疾病的调查过程中发现，这种疾病与 5 号染色体长臂有关，因为该家族中均存在有这种染色体和 FAP，因此，定位克隆就开始于 5 号染色体长臂基因座位，并最终使 FAP 相关基因被完全克隆。

（二）候选基因

如果一种疾病的基因座位还没有被发现，那么可采取另一种办法即利用 DNA 标记从“候选基因”中筛选分离。例如，对于心肌病来讲，候选基因可能是肌球蛋白基因，因为其产物是心肌的一种组成成分。如果已知了基因座位或已得到候选基因，研究者的第一步工作应是利用 DNA 多态性的连锁分析，证明这种疾病与某个基因座位有关，这是制作基因图的第一步。

（三）DNA 多态性

DNA 多态性主要是指由以下机制导致的 DNA 片段长度的变化。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

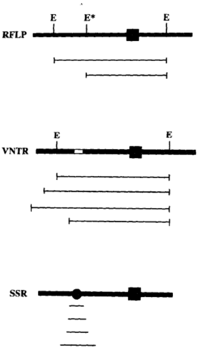


图 2－13　三种 DNA 多态性 RFLP，VNTR 和 SSR 的比较

DNA 多态性由核苷酸序列的改变而造成，这些改变导致限制性内切酶消化特异的 DNA 片段后的片段长度发生变化，或 PCR 扩增特异片段后的扩增片段长度的发生变化。RFLP：一段 DNA 用限制性内切酶"E"消化，此片段可能通过 DNA 探针用 Southern 杂交方法确定，探针将杂交于标记有■的部位；也可用 PCR 扩增此特异性的区域。如果没有影响单一限制性酶切位点（E＊）的点突变，酶 E 将 DNA 在两 E 末端消化，产生片段 1；如果出现了 E＊位点，酶 E 将从此位点到右侧 E 位点消化 DNA，产生片段 2。因此，RFLP 具有双等位性，即根据是否有多态酶切位点的出现而具有两种可能性（增大或缩小）。相反，多等位性的 VNTR 具有更多多态性的可能，因而更具有参考价值。因为在 E 特异性酶切片段的改变是由于插入了可变的重复单位所引起，因此，DNA 多态片段的数量将更多（图中显示了四种不同分子量的片段）。正是由于其内在的更大的变异性，在多态研究中，VNTR 通常更易在等位点上测定到杂合性图象。RFLP 和 VNTR 都能用 Southern 和 PCR 进行分析，但因 SSR 分子量要小得多，因而只有用 PCR 才能测定到。SSR 是由于如象 $(AC)_n$ 这样的简单序列重复（●）所引起的多态性，其中 n 为任意数字。含有 SSR 的 DNA 扩增将产生各种大小不同的片段

1. 点突变　偶然发生的点突变使限制性核酸内切酶识别位点缺失或增加，这种多态性称为限制性片段长度多态性（RFLP）。RFLP 是双向等位的，也就是说，这种多态性 DNA 或者由大片段组成，或者由小片段组成。

2. 插入　在一段 DNA 片段上，两个限制性内切酶识别位点之间出现重复序列构成的插入片段。这些重复可以是任一次数，因此最终的结果就是多等位基因多态性，它拥有各种长度，称为小卫星体（minisatellites）或变异性前后序列重复（varible number of tandem repeats，VNTR，图 2－13）。

3. 微卫星体　核酸序列重复次数不同，但其序列是由 2～4 个核苷酸碱基构成的简单重复图谱，称之为微卫星体（microsatellites）或简单序列重复（simple sequence repeats，SSRs，图 2－13）。

在一个家族中，DNA 多态性是按孟德尔规律遗传的。习惯上，如果单独一个碱基的变化在人群中发生率在百分之一以上，称为一个 DNA 多态。DNA 多态性在区分一个基因座位上两个等位基因的差别方面是一种极有价值的标记。在家族研究中，一种表型（可能是正常或不正常）和一种特殊多态性 DNA 的共同分离，将间接地检测到基因座位。现在，在各种 DNA 多态性模式的基础上，预测每个个体相关的疾病状态是一种常常采用的方法。在法医学分析中，DNA 多态性也能提供有用的信息。

二、基因图

一旦一种 DNA 标记物被发现与一种遗传性缺陷相连锁，即有必要沿着这条线索构建此基因座位的遗传图谱和物理图谱。遗传图谱的绘制主要依赖于观察多个有关家庭的 DNA 多态性，多态性 DNA 与基因连锁越紧密，重组（DNA 断裂、重新形成 DNA）的可能性将会越小。最终，与基因有关的多态性 DNA 自身将不再重组。

在缩小搜寻范围方面，前面所提及的在开始定位克隆时，选用的染色体或候选基因座位的确定方案，是非常有用的，但并不是必需的。许多情况下，定位克隆用于与疾病基因座位连锁有关的 DNA 探针的随机测试。这种方法很乏味且冒险，但是已有许多成功应用的实例。例如：Huntington 病和

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

成人多囊肾等。人类基因组计划发现的 SSR－类型多态性，将不断加速定位克隆的发展。现在，已经有许多具有专业知识技术和资源的国际实验室，在一个相对较短但有效的时间内开展全人类基因组研究。

三、物理图谱

与基因图不同，物理图谱是建立在实际的测量基础之上的，例如 kb 或 Mb。脉冲电场凝胶电泳(PFGE)、原位荧光杂交技术(FISH)和 YACs 等的应用，在构建物理图谱和染色体步移等方面都极有价值。这些新技术使定位克隆在分离基因的工作中成为更加实用的方法。从包含有克隆 YACs 中，可以发现及鉴定基因，直到找到正确的基因为止。

1984 年，Schwartz 和 Cantor 发明了基因作图的改良方法——脉冲电场凝胶电泳(pulsed field gel electrophoresis，PFGE)。这项技术使 DNA 图谱的规划范围从几千个 bp 增加到了几兆个 bp。PFGE 的实际应用成为现实取决于两项技术的发现：①分离到不是常用的但能将 DNA 切成较大一些片段的限制性内切酶；②非均一性及间断性脉冲电场的应用(图 2－14)。

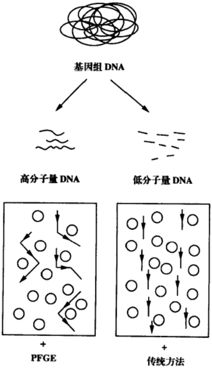


图 2－14　脉冲场凝胶电泳(PFGE)

这种方法能分离在传统的电流状态下共同泳动的大片段分子。PFGE 需要：1. 高分子量 DNA(通常来自于细胞系)；2. 识别稀有 DNA 序列的限制性内切酶，很少消化 DNA；3. zig－zag 电泳装置。由于 DNA 带负电荷，因此，可通过凝胶颗粒(圆形)向电场的阳极移动；由于电场的方向改变，DNA 片段呈现出蛇形移动；由于电场极性的周期性改变，使大分子被分离。这些分子相对于新电场的再定位则取决于片段的大小。与 PFGE 相反，传统电泳中的小分子 DNA 片段只向一个方向移动

用来做 PFGE 的 DNA 需特殊准备。首先要避免那些将 DNA 切割成相对较小片段的随机切割。稀有酶将 DNA 切割消化成为100～2 000 kb 范围内的片段。应用持续、均匀的电流(如传统的基因图谱制作中所采用的一样)时，大的 DNA 片段(如 100～500 kb)很难被分离，因为当 NA 通过琼脂糖孔时，由于电场控制产生的向前运动，将会产生摩擦，从而不允许大分子量的 DNA 产生不同的迁移率。在 PFGE 时，则可以通过改变电场，使大分子量的 DNA 产生不同的迁移率。因为每一次电场改变时，大分子 DNA 改变方向，并寻找到一条通过凝胶的新途径。改变电场方向的时间依赖于片段的长度，超过 10Mb 以上长度的限制性片段都可以通过 PFGE 区分开来。这项技术正逐渐应用于构建 DNA 物理图谱。通过 PFGE，也可以从凝胶中克隆到大的 DNA 片段。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

四、基因解码

基因解码(gene decoding)是 Collins 首先使用的名词,用来描述定位克隆策略已经成功后,印证发现了什么基因或发现的是不是正在寻找的基因。为了回答这些问题,基因(通常是 cDNA,因为 cDNA 只代表外显子,比总 DNA 或基因组 DNA 结构小一些)通常需进行序列测定。所得到的序列通过 Internet 可以输入不同的 DNA 和蛋白质数据库,例如基因库(GenBank)——DNA 信息的主要集中地之一。然后,使用计算机程序搜寻,在数据库中将最新发现的基因与原有库中基因进行比较,可能出现三种情况:①在数据库中发现完全一致的匹配结果,也就是说,新发现的基因早已有人报道,所谓的"新发现"成了重复性的工作;②没有发现匹配结果,也就是说,新发现的基因确实是新的,但是与它可能相关的因素,则没有一点线索,定位克隆常常停止于这一步,直到将来得到其他信息,才能证明此基因的作用;③在数据库中发现与另一个报道的基因有同源性。这是最好的结果,因为这说明基因依旧是新发现的,而且有关基因功能的线索也可能从与它共有某些 DNA 序列的基因中得到。

第七节　突变分析

突变分析指确证导致疾病或功能异常的 DNA 变化。测定 DNA(RNA)上的突变,要求许多条件:①物理图谱;②克隆或扩增 DNA;③一个或几个核苷酸碱基的 DNA 变化的筛选方法;④电泳分离 DNA 片段;⑤序列分析。

一、DNA 缺失的检测

通过 PCR 可以发现 DNA 上很小的缺失(如囊性纤维化);大一些的缺失(如 α-地中海贫血),可能需要作 Southern 杂交分析;最大的缺失(如连续基因综合征,continuous gene syndromes)可通过 PFGE 或 FISH 来检测。

二、检测点突变

从导致遗传变异的角度来看,点突变的发生率比缺失更高一些;与缺失相比,点突变的检测更难一些。因为它们很小(通常仅仅是一个碱基对的突变),且具有杂合性。在检测点突变时,PCR 是一个非常有用的技术。

三、筛选 DNA

在过去的几年中,人们逐渐认识到从人 DNA 扩增产物中筛选出突变的 DNA 的重要性越来越大。在有关医学分子生物学的专著中,都有专章详细介绍 Duchenne 肌营养不良症、血友病和家族性心肌肥大症中突变分析。

从 DNA 中筛选点突变的方法(图 2-15)包括:变性梯度凝胶电泳(denaturing gradient gel electrophoresis, DGGE),单链构象多态性(single-stranded conformation polymorphism, SSCP)和化学切割错配方法(the chemical cleavage of mismatch method, CCM)。前两者是依据一个或多个核苷酸碱基不配对的单链 DNA 的运动转移率的变化而设计。后者的原理主要是如果在核苷酸碱基之间存在错配,那么就会有化学反应存在。这些方法可快速地筛选出例如突变、多态性等

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

变化,但并不能证明 DNA 序列的实际变化,它们仅是一个筛选方案。

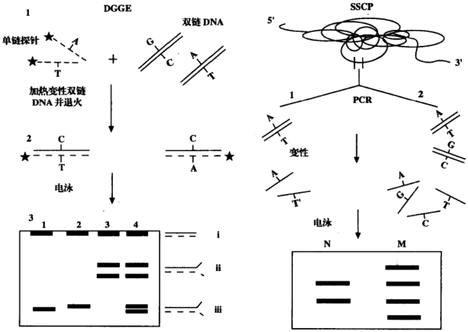


图 2－15　用变形梯度凝胶电泳(DGGE)(左)和单链构象多态性(SSCP)(右)筛选点突变

左图:在 DGGE 中,单碱基的改变被检测为双链(ds)中的错配点,这些错配的碱基在变性凝胶中电泳时可引起链的分离,表现为泳动位置的改变。1.放射标记针对野生型 DNA 序列的单链(ss)DNA 探针(★),与包含有正常(－A－,－T－)和突变(－G－,－C－)序列的靶双链 DNA 混合。后者来源于点突变(正义链的 A 到 G,反义链的 T 到 C)。用^{32}P 标记的单链探针含有正常的 DNA 碱基序列(关键区域为...A...,互补链为...T...)通过加热得到单链靶 DNA;2.当温度逐渐下降时,探针和靶 DNA 退火,并且形成含有错配碱基对的异源双链体(A+G,T+C),同时也形成含有正确配对的同源双链体(A+G,T+C),但在图中未显示;3.通过从 i 增加到 iii 的变性梯度电泳。在图中的 i 位,DNA 形成双链;随变性梯度的增加,不配对的区域将被解链并使 DNA 结构发生变化,从而降低了 DNA 的运动。图中泳道 1 和 2 说明野生型(A+T)和突变的同源双链体对照(G+C)各自的运动。泳道 3 表明,由于异源双链体含有不配对的碱基,因而不稳定,从而其运动也较少;泳道 4 表明存有同源双链体和异源双链体的混合物。如果只有野生型序列被^{32}P 标记并用放射自显影 DNA,那么在泳道 4 中就检测不到突变的同源双链体;如果 DNA 用溴乙啶染色,就能显示 DNA 条带。右图:来自某一特定区域的 DNA 被扩增。1 中,这个区域是正常的;2 中,含有一个突变的等位基因。DNA 被变性为单链后,在无变性的凝胶中电泳,DNA 的运动受它本身的长度和序列的影响,图中显示两条正常(N)的单链 DNA 带,同时,如果再现了不同的泳动片段,则表明具有不同序列(M)的 DNA 片段出现

1983 年,Fischer 和 Lerman 首先报道了 DGGE。这是一种将含有突变片段的 DNA 与相应的野生型 DNA 片段比较,寻找出甚至一对突变碱基的方法。靶 DNA(基因组、克隆或扩增产物)通过退火与一条放射性标记单链探针结合。如果靶 DNA 包含有点突变,靶 DNA 和探针就会形成异源双链体(具有错配碱基的 DNA 双链)。然后 DNA 通过线性变性梯度电泳(如加入尿素、甲酰胺或温度梯度),在一定的变性水平上,双链 DNA 的某一区域将变成单链,因此产生了

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

一个分枝结构，并在凝胶基质孔中形成网状，从而阻碍 DNA 的进一步运动。正常的迁移运动形成的图像可以从同时进行的野生型同源双链体迁移模式中看到。这样，核苷酸碱基的变异就可以从其运动迁移率中区分出来。

SSCP 是更为流行的筛选方法。用这个方法，由消化 DNA 或 PCR 产生的 200～300 bp 大小的 DNA 小片段，被变性成为单链，在非变性丙烯酰胺凝胶中电泳。单链 DNA 的泳动与长度和序列有关，这样，DNA 上的点突变就会导致迁移率的不同。SSCP 正在逐渐替代 DGGE，因为它在检测单个碱基改变方面容易使用，并且重复性好。

CCM 正在修改完善，现在已开始使用酶，而不是最初所使用的有毒化学物质，这将成为筛选 DNA 上一个变化碱基的另一个有用的方案。

四、点突变的证实

突变检测的“金标准”是 DNA 测序，但是 DNA 测序的过程很长，通常只是在最初的证明和一种特殊突变的确定时使用。因此，人们又发明了更为快速的方法检测在其他特殊种属的相同的突变。DNA 单个碱基变化的检测，已经与医学的许多领域有关，它们包括遗传学，确定遗传性疾病；肿瘤学，寻找与癌基因有关的突变；微生物学，为了流行病学的目的。

如果已知的点突变偶然发生在一种限制性核酸内切酶识别位点上，即可利用这种内切酶对该点突变进行检测，同时产生一条新的限制性内切酶片段。检测点突变的另一更为先进的方法就是与等位基因特异的寡核苷酸(ASOs)杂交。即合成两条寡核苷酸探针，一条探针将与野生型(正常)序列杂交，另一条探针将与突变 DNA 杂交。杂交的图像将确定相应的遗传型，如单一突变探针杂交——与那些突变完全吻合，单一野生型探针杂交——正常，既有突变也有野生型的探针杂交——杂合子。

在遗传性疾病的诊断过程中，寡核苷酸 DNA 探针得到了广泛的使用。而且，它在 DNA 文库的筛选中也很有用。扩增的 DNA 是寡核苷酸探针杂交的理想目标，探针可以用^{32}P 进行末端标记，或与化学物质、酶、荧光素联接均可。但由于寡核苷酸 DNA 探针长度很短，当与基因组 DNA 杂交时，其功能受到限制。在这种情况下，需要考虑杂交背景。

最近，另一种检测特殊类型点突变的方法蛋白质缩短试验(protein truncation，图2－16)已经发展起来。这种方法是形成一种提前终止密码(premature stop codon)，因此产生了一种变短的(“缩短的”)蛋白质产物，突变检测的依然是 DNA，但是测定的是蛋白质。蛋白质缩短试验已被证明在检测与大片段基因突变、多重无意基因突变或移码突变有关的疾病方面很有用。例如，家族性结肠息肉中的 APC 基因，乳腺癌中的 BRCA1 基因等。

第八节　染色体分析

染色体分析主要指染色体的形态学研究，以确定它们的数量和结构的变化。染色体分析包括以下各个步骤：①细胞培养；②依照染色体长度，扩展染色体，即染色体核型；③放射性或荧光素标记 DNA 探针；④使用人类或非人类细胞进行细胞融合。

一、染色体核型

染色体核型(karaotype)是用来描述一个个体的染色体情况。1956 年，只显示人类二倍体

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

染色体数目为46;在70年代,已经产生了区别个体染色体区带的方法。现在通过显带技术,可以清楚地计数和定性人类的44个常染色体和X或Y性染色体。最常见的方法是G-显带技术,它是在胰酶处理染色体后,采用姬姆萨(Giemsa)染料染色,使每一条染色体产生深浅不一的染色带。浅带(常染色质)最有可能与基因有关;而由深色带(异染色质)组成的DNA可能富含重复序列。

显带图形、染色体长度和着丝粒的位置,可以使每个个体的染色体准确定位(图2-17)。随着G-显带技术的不断改进和应用,现在可根据单倍染色体模式检测条带数量。条带平均数量为550,每个条带估计大约包含$(5\sim10)\times10^6$个DNA碱基对,在每条条带中大约有100个基因。但基因数随情况不同而有所变化,因为某些基因很小(例如血红素基因为1 kb),而某些基因很大(例如Duchenne肌营养不良基因大约为200 kb长)。某些染色体,例如,19号和22号,比其他染色体,如13号、18号和Y染色体包含更多的基因。

细胞基因的命名采用1985年国际人类细胞基因系统推荐的方案。着丝粒,是染色体的限制部分。两条染色单体在着丝粒处相结合,着丝粒又将染色体分为短臂(以p表示)和长臂(以q表示)。每个臂又被分为可被特殊标记物标记的不同区域,沿着每一条臂从着丝粒到端粒,每个区域和条带都可用数字标记。因此,每一条条带有四个符号描述它的成分,例如:7q31染色体上的囊性纤维化基因座位,指的条带就是第7号染色体,长臂3区第1条带。其他的信息可以通过更高级的显带分析技术得到,例如检测亚条带,在这种情况下,囊性纤维瘤基因座位变成为7q31.3,这里的3就是用来定义亚条带的。

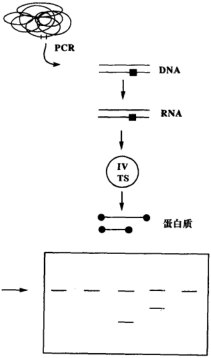


图2-16 蛋白缩短测试(PTT)

这是一种较新的分析方法。假如点突变造成了成熟前终止密码的形成,以至于两个等位基因中的一个基因产生了更小的多肽片段(即被缩短),即可使用蛋白缩短测试(protein truncation test, PTT)。首先通过RT-PCR从mRNA中获得目标基因,或者从基因组中从PCR自每个外显子获得相应的目标基因(■显示的是在DNA链上成熟前终止密码的部位);cDNA或基因组DNA的信息通过体外转录系统被转移进mRNA,由于其中一个等位基因含有成熟前终止密码,从而形成两种不同的RNA;最后一步涉及到体外翻译系统,此系统将RNA翻译为蛋白质。相应的,将获得两种不同的蛋白质,具有突变者其蛋白质分子量更小。蛋白质通过电泳分离,较小的(被缩短者)具有更快的迁移率(→正常蛋白)

二、荧光素原位杂交

荧光素原位杂交技术(fluorescence in situ hybridisation, FISH)的发展使它比染色体显带技术具有更强的实用性。现在,放射性标记的探

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

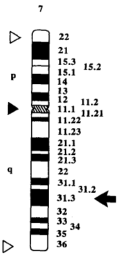


图 2-17 人类 7 号染色体各带模式

每条带都用数字进行描述，短臂和长臂分别由 p 和 q 表示，实体三角形所指为着丝点，空心三角形所指部位为染色体两端的端粒，箭头所指部位为 q31.3

针可以在染色体中期确定单拷贝 DNA 序列在染色体上的位置；原位杂交中也能用 DNA 探针确定染色体位置。在过去几年中，非放射性原位杂交的出现，特别是 FISH 的出现，极大地促进了染色体原位杂交技术的应用。在同一程序步骤中，使用许多种不同荧光标记的 DNA 探针，即能确定不同的基因座位。从长远看，FISH 将具有重要作用，甚至比 PFGE 更加重要。由于染色体在间期比在中期更加伸展，在间期应用 FISH 技术甚至可以进一步解决 DNA 探针定位及染色体重排，例如遗传性疾病或恶性疾病的微小缺失等问题。

三、体细胞杂交

通过一种介质，例如仙台病毒，可以使人类细胞与来自于其他动物（如鼠类）的肿瘤细胞融合。融合后，杂交细胞中既有人类染色体，也有非人类染色体。之后，这些染色体，特别是人类染色体，将会从融合细胞中逐渐丢失，直到细胞经过多代后，变得更加稳定为止。通过使用选择性标记物，如杂交瘤并提高其稳定性，可使带有人类染色体的杂交瘤在一种特殊的媒介中更容易被培养存活。每一个稳定的杂交细胞可以被扩大增殖，形成一个细胞系，当然，这些细胞系在染色体数目上与人类的其他细胞不同。细胞系的染色体核型将会证明存在着哪一条人类的染色体。然后，这些细胞系可以用于 DNA 图谱的制作，即获得了 DNA 探针，但却不知道它在基因组的确切位置，这条探针可以与体细胞杂交瘤杂交，杂交后，一些杂交瘤即有阳性结果，而一些获得阴性结果。从这个结果可决定 DNA 探针在染色体上的起源，例如 1 号体细胞系具有人类染色体 1,3,7；2 号体细胞系具有人类染色体 1,5,8,19；3 号体细胞系具有人类染色体 1,12,15,18,21；4 号体细胞系具有人类染色体 3,4,6,19。如果 DNA 探针与 1,2,3 号体细胞系杂交，但与 4 号不杂交，那么探针就很可能定位在 1 号染色体。

第九节 重组 DNA 的表达

使某个基因具有功能，并在一个人工环境中产生出其相应蛋白质产物的过程，称为表达。重组 DNA 的表达要求：①克隆 DNA；②表达载体；③显微注射。

一、体外表达

最基本的表达载体是质粒，它具有复制起始位点、DNA 选择性标记（可使它易被检测到）、具有生长优势、插入的基因可以在多个克隆位点被表达等特点。带有插入基因的载体转染进入宿主细胞，例如 *E. coli*，并被允许复制。通常，通过一个抗生素抗性基因进行筛选，以确保只有插入了质粒的 *E. coli* 能够生存下来。在原核系统，细菌蛋白质能被表达，但真核系统的产物如果不与细菌蛋白融合，将会被降解。表达蛋白被分离纯化，可以用作治疗性制剂（图 2-18）。更复杂一些的体外表达系统使用酵母、昆虫或哺乳动物得到的载体。在非细菌性表

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

达系统中,蛋白质产物能够发生转录后变化,具有生物活性意义。

体外表达系统也可以用来检测基因功能,特别是那些与启动子有关的区域。例如,氯霉素乙酰转移酶可以包含在表达质粒中,然后可把原核启动子序列从5′端插入到氯霉素乙酰转移酶基因中,最后可以通过观测启动子对产物的作用检测其活性。那些在克隆位点具有5′启动子的质粒载体也能够产生RNA转录物,启动子可以被DNA依赖的RNA聚合酶识别,并由此产生RNA而不是DNA,用这种方式生成的RNA转录物可用作RNA探针,或验证体内mRNA的质量。

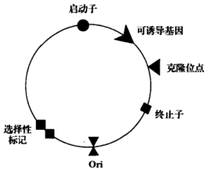


图2-18 一种理想的细菌表达载体

载体具有独立复制(ori)位点,使载体具有独立复制的能力;具有在宿主细胞内选择性标记物(通常有抗生素抗药性),使重组菌(通常为大肠杆菌)得到了很好的生长;细菌的启动子保证了转录过程的进行;具有细菌特异性的诱导性基因使表达得以控制;表达的DNA序列插入到多克隆位点,转录由位于多克隆位点下游区的终止信号控制;混合物(来自于诱导基因和克隆基因的蛋白质)的表达,可以保护非细菌性的蛋白质不被降解,两种成分继之可以被分离,并且表达蛋白质可以从细菌的产物中得以纯化

二、体内表达

具有生育能力的卵母细胞包含两个前核,DNA克隆中的某一基因可以被显微注射进去,被注射的DNA(外源DNA)在卵母细胞DNA上以多拷贝的形式随机融合为一个整体。可从头至尾形成串联排列。如果拷贝数量充足,且已融为一体的DNA进入的环境适宜,外源DNA即会表达(图2-19)。转基因动物(通常是小白鼠,带有异源基因)通过Southern印迹或PCR可以筛选它们的DNA,从而寻找出它们。如果一个诱导启动子包含在基因结构中,转基因的表达可能会发生改变,例如存在金属时。启动子在重金属存在的情况下具诱导性,当需要"关闭"这个转基因时,可使动物增加饮水来达到。

转基因小鼠在体内表达系统中很有利用价值,可以利用其测试基因的功能、意义、基因序列或启动子;但这项技术存在不足之处:常包含一些相对无效的转基因产品,无法控制基因融合为一体的位点,以及转基因经常为低表达。为了克服融合问题,胚胎干细胞逐渐受到欢迎。因为它可以利用同源重组物把目的基因结合到正确的染色体位置上。那些具有正确融合基因的胚胎干细胞可以被检测,这些被检测出来的胚胎干细胞被显微注射进入囊胚,从而产生嵌合

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

动物。它们代表着接近于体内环境的模型，因为插入的 DNA 正好位于它在基因组中“本身”的位点。

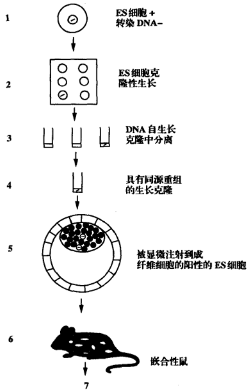


图 2-19　胚胎干细胞用于体外表达重组 DNA

此方法产生的转基因鼠可以用于体内测试基因的功能。1.胚胎干细胞(ES 细胞)用异源性 DNA 转染，许多 ES 细胞都会被 DNA 转染，但此过程在 ES 细胞中通过随机整合的方式整合人鼠细胞基因组不同部位，在很少的情况下，整合会通过同源重组的方式发生于基因组的正确部位；2.生长的 ES 细胞克隆；3.DNA 自克隆细胞中分离；4.通过 PCR 确定同源重组的克隆；5.具有同源重组 DNA 的 ES 细胞被显微注射到成纤维细胞；6.使用不同颜色的鼠作为 ES 细胞(如白色)的来源和成纤维细胞(如黑色)的来源，将使嵌合体鼠易于被识别；7.如果转基因被整合到了生殖细胞，将有可能通过适当的交配获得纯合子动物

（陈谦明　钟　利）

参 考 文 献

1 Trent RJ. Molecular Medicine: An Introductory Text. 2 ed, New York: Churchill Livingstone, 1997
2 Fergson DB. Aspects of oral molecular biology. 1 ed, 1991
3 Slavkin HC. Recombinant DNA technology and oral medicine. Ann New York Acad Sci, 1996;315
4 Sambrook J, Fritsch EF, and Maniatis T. Molecular cloning, a laboratory manual. 2 ed. Cold Harbor Laboratory Press, Cold spring, New York, 1988

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第三章 牙发育及先天性唇腭裂的分子生物学

第一节 造釉蛋白的分子生物学

一、概 述

牙釉质的形成是生物矿化过程的一个典型范例。牙釉质为生物体中高度矿化的组织，其成分 85%为羟磷灰石晶体。羟磷灰石晶体具有显著的生物特性，表现在其晶体的大小、高结晶度和在组织中的高度有序排列等方面。研究认为，羟磷灰石的这些生物学特点，均与釉质发育过程中无机矿物质和某些特殊的细胞外基质蛋白的相互作用有关。

目前关于哺乳动物釉质发育的研究表明，牙釉质的发育是由一系列完整的、但并非连续的步骤所组成，包括分泌、转化和成熟等多个步骤。Hiller 和 Robinson 等学者从生物化学基础、结构特点及其相邻造釉细胞的形态变化等不同角度对这一过程进行了划分和描述。

在分泌阶段，当造釉细胞分泌蛋白基质后，很快被细长的羟磷灰石晶体所结合矿化，并按有机基质的方向有序排列，从而分别形成直径约 5～7 微米的釉柱(enamel prism)晶体和位于釉柱间的柱间晶体。这些釉柱的形成是在造釉细胞上一种被称为童氏突(Tomes process)的、具有分泌功能的特殊结构的末端完成，而釉柱间晶体则在与童氏突的旁边组装形成。因此，童氏突的形态对釉柱和柱间质的形态发育具有引导作用。在人类和其他一些生物中，由于童氏突形态学的特点，导致其釉柱和柱间质的区别并不明显；而在以牛为代表的另一些动物中，釉柱和柱间质间的区别则非常明显，这可能也和这些生物的童氏突的结构特点有关。尽管目前知道釉柱和釉间质的形成是由造釉细胞分泌的蛋白所诱导，但由于尚难以将釉柱和釉间质完全分离后进行相关研究，因此，尚不清楚究竟诱导釉柱和柱间质形成的蛋白是否完全相同，故在下文中暂将二者合并讨论。

有研究表明，在分泌期，由造釉细胞分泌的胞外基质中 90%由造釉蛋白(amelogenin)所组成，其余 10%则包括了富脯非造釉蛋白、簇蛋白、血清蛋白以及至少一种唾液蛋白。但这些非造釉蛋白的准确数量、种类及相应的功能尚不清楚。还有研究发现，在牙釉质发育过程中的基质内可以检测到一过性的蛋白水解酶和磷酸化酶的活性，提示在某些阶段，在这些非造釉蛋白中可能还有酶类蛋白的存在。

造釉蛋白在氨基酸组成上具有比较显著的特点，脯氨酸占其氨基酸总量的 25%～30%，而其他一些具有高度疏水性的氨基酸如组氨酸、谷氨酸、亮氨酸的含量也较高。造釉蛋白中大量疏水分子的存在，提示造釉蛋白在牙发育过程中可能是在胞外分解，例如可能被酶类水解为一些小分子蛋白或多肽。

造釉蛋白的降解过程在其由造釉细胞分泌后即已开始。新分泌的蛋白位于基质的最外层，含有大量的未降解造釉蛋白；而先前分泌的造釉蛋白则位于基质的内层，其中含有较多的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

造釉蛋白降解后的小分子蛋白或多肽，因而造成了基质中造釉蛋白的异质性。另一方面，其他一些因素如性染色体基因的异质性、mRNA 的可变剪切(alternative splicing)等，也可能进一步加剧这种异质性。此外，有学者认为一些转录后修饰过程如磷酸化、糖基化等，也可能是造釉蛋白异质性的原因之一，但此观点目前尚存在一些争议。

分泌阶段结束，组织的厚度发育即完成，接着进入转化期。在这一时期，造釉蛋白的分泌停止，有机基质成分逐渐减少。接着进入成熟期，大部分无机物在这一时期沉积于组织中。在成熟期，尽管组织中以无机成分为主，仍然可以检测到少量的蛋白成分。对其来源，目前尚无统一的结论，有学者认为是分泌期的蛋白残余成分，也有人认为这表明进入成熟期后，造釉细胞仍然存在低水平的蛋白分泌。

成熟期一个更为显著的特点是通过造釉细胞层进入组织中的无机物离子的大量增加。组织中无机物的浓度由 15% ~ 20%增加到 70% ~ 80%(体积比)，而且，由于单个羟磷灰石晶体体积的生长，分泌期形成的羟磷灰石骨架得到显著的生长和加强，形成了稳固的无机矿物质骨架结构。

以上是关于牙釉质发育的基本步骤。但在这一系列的过程中，有机基质的具体降解过程怎样，调节晶体的生长方式如何，以及这种高度有序的釉柱和柱间质的结构是如何形成的等诸多问题，目前还不清楚。下面主要从分子生物学的角度，将目前关于造釉蛋白在牙釉质发育中的结构、降解途径及其作用作一概要介绍。

二、造釉蛋白的基因调控

现在已经比较明确，造釉蛋白是由多种异质性的分子所组成，这些分子在分子量大小和结构上有一些细微的差别。如前所述，在很大程度上，这种分子的异质性与分泌后在细胞外的降解等过程有关，同一分子在细胞外经过不同的酶解、磷酸化等过程形成不同的蛋白分子。但另一方面，也有一些异质分子并非这一过程的作用产物，而是性染色体二态性和造釉蛋白mRNAs可变剪切的结果。

(一)性染色体二态性

在猪和大鼠等生物中，编码造釉蛋白的基因仅位于 X 染色体上，而牛的该基因则同时存在于 X 和 Y 染色体上。人类基因与牛相似，在 X 和 Y 两种性染色体上都有该基因的位点。进一步的观察发现，人类和牛位于这两种性染色体上的造釉蛋白基因都可以被转录和表达。对 26 周龄胎儿的研究发现，在总的造釉蛋白中，约有 10%是位于 Y 染色体上的造釉蛋白基因的转录产物，而其余部分为 X 染色体的表达。但是，X 和 Y 染色体的造釉蛋白基因并非 100%同源，二者转录的 mRNAs 也各自通过不同的、相互独立的过程进行剪切，所以必然得到不同的转录产物，从而造成造釉蛋白的异质性。这种由于性染色体的二态性所造成的造釉蛋白异质性的生理意义目前并不清楚，有人认为男性的牙齿相对较大可能与此有一定关系，但也可能是一种没有任何生理和病理意义的基因多态性的表现。

(二)mRNAs 的可变剪切

研究表明，人和猪的造釉蛋白基因均由 7 个以上的外显子组成，其中比较明确的只有 7 个外显子。但根据目前的研究结果，在人、牛、猪和大鼠等种属中，主要的 mRNA 产物都只含有 6 个外显子的转录，均剪除了 4 号外显子。这种 mRNA 所最终表达的造釉蛋白构成了将来分泌进入细胞外基质的成熟釉蛋白的主体部分。根据人 cDNA 文库推断，外显子 4 应该编码 14 种

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

氨基酸，而猪的外显子 4 则编码 17 种氨基酸。有趣的是，尽管人和猪造釉蛋白基因的其他外显子编码氨基酸序列呈现高度的同源性，但外显子 4 所编码的氨基酸中仅有两种相同，这种差异之大是很少见的。具体情况如图 3－1 所示。剪除了外显子 4 后，其他 6 个外显子的转录产物编码的蛋白是将来分泌的主要造釉蛋白。这 6 个外显子的情况如下：

a)

外显子 2 →	← 外显子 3 →	← 外显子 5 →	← 外显子 6
BovXMGTWILFACLLGAAFSMP	LPPHPGHPGYINFSYE	VLTPLKWYQSMIRHPYP	SYGYE(40)
BovYMGTWILFACLLGGAYSMP	LPPHPGHPGYINFSYE	VLTPLKWYQNMLRYPYP	SYGYE(40)
HumXMGTWILFACLLGAAPAMP	LPPHPGHPGYINFSYE	VLTPLKWYQS－IRPPYP	SYGYE(39)
HumYMGTWILFACLVGAAFAMP	LPPHPGHPGYINFSYE	VLTPLKWYQSMIRPPYS	SYGYE(40)
Por MP	LPPHPGHPGYINFSYE	VLTPLKWYQNMIRHPYT	SYGYE(40)
Mur MGTLILFACLLGAAFAMP	LPPHPGSPGYINLSYE	VLTPLKWYQSMIRQPYF	SYGYE(40)
Rat MGTWILFACLLGAAFAMP	LPPHPGSPGYINLSYE	VLTPLKWYQSMIRQPYP	SYGYE(40)

外显子 6(续)

BovX(41)PMGGWLHHQIIPVVSQQTPQNHALQPHHHIPMVPAQQPVVPQQPMMPVPGQHSMTP(96)
BovY(41)PVGGWLHHQIIPVVSQQSPQNHALQPHHHNPMVPAQQPVVPQQPMMPVPGQHSMTP(96)
HumX(40)PMGGWLHHQIIPVLSQQHPPTHTLQPHHHIPVVPAQQPVIPQQPMMPVPGQHSMTP(95)
HumY(41)PMGGWLHHQIIPVVSQQHPLTHTLQSHHHIPVVPAQQPRVRQQALMPVPGQQSMTP(96)
Por(41)PMGGWLHHQIIPVVSQQTPQSHALQPHHHIPMVPAQQPGIPQQFMMPLPGQHSMTP(96)
Mur(41)PMGGWLHHQIIPVLSQQHPPSHTLQPHHHLPVVPAQQPVAPQQPMMPVPGHHSMTP(96)
Rat(41)PMGGWLHHQIIPVLSQQHPPSHTLQPHHHLPVVPAQQPVAPQQPMMPVPGHHSMTP(96)

外显子 6(续)

BovX(97)TQHHQPNLPLPA－－－－QQPFQPQSIQPQPHQPLQPHQPLQPMQPMQPLQPLQPLQP(148)
BovY(97)TQHHQPNLPLPA－－－－QQSFQPQPIQPQPH－－－－－－－－－－－－－－－－QPLQP(127)
HumX(96)TQHHQPNLPPPA－－－－QQPYQPQPVQPQPH－－－－－－－－－－－－－－－－QPMQP(126)
HumY(97)TQHHQPNLPLPA－－－－QQPFQPQPVQPQPH－－－－－－－－－－－－－－－－QPMQP(127)
Por(97)TQHHQPNLPLPA－－－－QQPFQPQPVQPQPH－－－－－－－－－－－－－－－－QPLQP(127)
Mur(97)TQHHQPNIPPSAQQPFQQPFQPQAIPPQSH－－－－－－－－－－－－－－－－QPMQP(131)
Rat(97)TQHHQPNIPPSAQQPFQQPFQPQAIPPQSH－－－－－－－－－－－－－－－－QPMQP(131)

外显子 6(续) →	← 外显子 7
BovX(149)QPPVHPIQPLPPQPPLPPIFFMQPLPPMLPDLPLKAWPATDKTKREEV	D(197)
BovY(128)QPPVHPIQRLPPQPPLPPIFPMQPLPPVLPDLPLEAWPATDKTKREEV	D(176)
HumX(127)QPPVHPMQPLPPQPPLPPMFPMQPLPPMLPDLTLEAWPSTDKTKREEV	D(175)
HumY(128)QPPVQPMQPLLPQPPLPPMFPLRPLPPILPDLHLEAWPATDKTKQEEV	D(176)
Por(128)QSPMHPIQPLLPQPPLPPMFSMQSL－－－LPDLPLEAWPATDKTKREEV	D(173)
Mur(132))QSPLHPMQPLAPQPPLPPLFSMQPLSPILPELPLEAWPATDKTKREEV	D(180)
Rat(132)QSPLHPMQPLAPQPPLPPLFSMQPLSPILPELPLEAWPATDKTKREEV	D(180)

b)

人类 外显子 4 NSHSQAINVDRTAL
猪 外显子 4 KSGSWGAXLTAFVSXVQ

图 3－1 不同种属主要造釉蛋白基因转录产物的氨基酸序列

图 a 中 BovX：牛 X 染色体；BovY：牛 Y 染色体；HumX：人 X 染色体；HumY：人 Y 染色体；Por 猪；Mur 小鼠；Rat 大鼠。图 b 示人和猪外显子 4 转录产物氨基酸序列的比较

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

外显子 1:编码成熟造釉蛋白 mRNA 的 5′非转录区的一部分;

外显子 2:首先是编码 5′非转录区的其余部分,其后是启动子、信号多肽编码区,以及最终分泌的造釉蛋白的前两个氨基酸残基的编码区;

外显子 3:编码 3~18 位氨基酸残基;

外显子 5:编码 19~33 位氨基酸残基,但在人 X 染色体连锁的造釉蛋白基因中,由于 28 位氨基酸(肌氨酸)缺失,该外显子 5 只编码 19~32 位氨基酸;

外显子 6:种属间长度差异大;

外显子 7:编码所有种属造釉蛋白的最后一个氨基酸(天冬氨酸)。在人类,造釉蛋白基因的外显子 7 还含有一个多聚腺苷化位点。需要说明的是,图 3-1 中人造釉蛋白的结束氨基酸序列与以前 Shimakawa 等的报道并不一致。现在认为,这种差异是由于 Shimakawa 等根据 DNA 序列推断的人造釉蛋白的氨基酸结束序列是 TDKTKREEVVSIF 时,未将外显子 7 包括在内,是从外显子 6 的 3′端向下游推算所致。而真正的终止信号应该在外显子 7 更下游才出现。

现在已经明确,造釉蛋白基因的外显子通过不同的剪切方式产生不同的成熟 mRNAs,这些转录产物可能包括了全部外显子,或者是剪除了某个外显子,或某个外显子的部分序列的部分转录产物。例如,一种被称为富亮氨酸造釉蛋白多肽(leucine - rich amelogenin peptide, LRAP)是牛和猪牙釉质发育过程中的胞外基质之一,有人从 LRAP 的 mRNA 建立了其 cDNA 文库,结果发现牛的 LRAP 是由造釉蛋白基因的外显子 1、2、3 和 5 组成,与其他由外显子 1、2、3、5、6 等组成的造釉蛋白不同的是,它的外显子 5 的 3′端不是与外显子 6 的 5′端相连接,而是跨过外显子 6,直接连接到接近外显子 6 的 3′端的一个编码谷氨酸的位点,从而通过这种不同的剪切方式表达一种不同的造釉蛋白多肽。

通过对小鼠的 cDNA 文库的分析发现,这种造釉蛋白 mRNA 的可变剪切现象并不少见。研究发现,在小鼠的造釉蛋白基因外显子 6 中,包括了 21 个 CAG 顺序(谷氨酸密码),这种顺序可以作为一种与上游结合的 3′受体,与其形成完整的剪切产物。因此,从理论上讲,这 21 个不同的位点就可以通过可变剪切产生多种不同的转录产物,如图 3-2 所示。

这些可变剪切所产生的转录产物在总的造釉蛋白中仅仅是很小部分,其意义目前尚不明确,可能是在一定时期、一定部位对其他的造釉蛋白分子起到了某种调节作用,但也可能是体内出现的无义性可变剪切现象。

三、造釉蛋白的分泌

在不同的种属,新分泌的造釉蛋白的绝对分子量略有不同,大约在 16~20 kDa。但是,目前这些关于分子量的研究结论大都来源于 SDS-PAGE 的实验结果,由于脯氨酸的含量较高,从而使在这些实验中,造釉蛋白的分子量往往被高估。

为与这些自 SDS-PAGE 研究所获结果相区别,以下提到的分泌期造釉蛋白大分子是指一种未经过任何胞外降解、分子量约 25 kDa 的造釉蛋白前体分子,这一分子量不包括前 16 位氨基酸残基、N 末端和输出信号序列等在分泌时被剪切部分的分子量。

图 3-1(a)所示为对人、牛、猪、鼠等的造釉蛋白的 cDNA 分析和直接蛋白测序所得的结果。除了牛的 X 染色体连锁造釉蛋白基因的外显子 6 编码区位和大鼠、小鼠造釉蛋白中的多余氨基酸残基外,其余种属的造釉蛋白序列高度保守,证明这些保守序列可能与其功能密切相关。牛的 X 染色体连锁造釉蛋白基因的外显子 6 编码区的多余氨基酸残基,可能是外显子 6

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

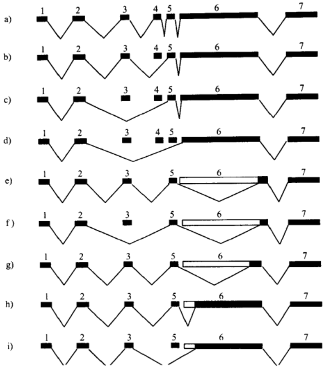


图 3-2　造釉蛋白基因的可变剪切示意图

实心表示完整的外显子，空心示外显子部分剪切；图示部分均不含内含子。

a)外显子 1～7 线形拼接(无剪切)，人类 X 连锁染色体造釉蛋白转录产物含 189 个氨基酸残基，猪则为 190 个氨基酸残基。这种转录产物在体内的检出量极小。

b)外显子 4 剪除，各种属的釉质发育中的造釉蛋白多数均为此剪除转录的产物。

c)外显子 3、4 剪除，产物少见。

d)外显子 3、4、5 剪除，少见。

e)外显子 6 的 5′端大部分剪除，表达产物缺乏降解为 LRAP 的位点。

f)外显子 3 的全部及外显子 6 的 5′端大部分剪除。

g)外显子 6 的 5′端大部分剪除，但外显子 6 残余部分的 3′端含有 LRAP 位点。

h)外显子 6 的 5′端少部分剪除，编码 156 个氨基酸残基，少见。

i)外显子 6 的 5′端少部分剪除，但剪除位点与 h 不同，编码 141 个氨基酸残基。

中的串联重复序列(tandem duplication)的产物。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

四、造釉蛋白的结构

有人用物理学方法对牛的分子量为 25 kDa 造釉蛋白前体的结构进行了分析和推测，X 衍射研究提示有 β 交叉或 β 折叠的存在，其轴向与多肽链的方向垂直；傅里叶转换、红外光谱分析和圆二色性分析(circular dichroism)的结果也提示牛的造釉蛋白的二级结构中含有 β 折叠或 β 转角与 α 螺旋的混合结构。

另一些研究结果表明牛的造釉蛋白的 N 端 1～40 位氨基酸残基含有多个 β 折叠结构，并在 20～26 位氨基酸残基之间有一个短的 α 螺旋分枝，其后的 41～119 位残基是一个球状位点，其中的 73～78 位残基形成 α 螺旋，最后，位于 C 端最末的 5 个氨基酸残基(150～197 位)以随机方式形成 α 螺旋结束。

在 120～149 位氨基酸残基出现 10 次谷氨酰胺－脯氨酸—蛋苷酸的三肽重复序列，主要以 β 螺旋的形式存在，形成了能结合未水化钙离子的孔状结构或通道。现在已知，编码这些重复氨基酸序列的基因位于牛的造釉蛋白基因外显子 6，这一序列在除牛以外的其他种属中均缺失，但这一序列的功能尚不清楚。

但是，在讨论釉蛋白分子的结构的时候，必须意识到造釉蛋白是一个包括了各种不同剪切产物、降解分子的多成分的混合体。在体内，这个混合体主要是以水化的、具有一定三维构象的固态形式存在。而且，造釉蛋白在体内的各项生理功能不仅与组成分子的各自结构有关，还和这些分子的相互影响密不可分。因此，尽管在体外对造釉蛋白的单一成分的二级或三级结构分析获得了上述的成果，但将这些成果直接推论到体内的价值却是有限的。

五、胞外造釉蛋白的降解

完整的分子量为 25 kDa 造釉蛋白前体，主要分布于分泌期牙釉质的外层，但这些蛋白在分泌后很快被降解，形成一系列的降解产物。为了明确这一降解过程的步骤，不少研究者对这些降解产物的成分进行了分析和氨基酸序列测定，初步描绘了降解的步骤。但由于对降解产物的组成还不够明确，这一过程的描述还很不详细。很显然，只有尽可能明确降解产物的组成和性质，才可能对下述的降解过程有一个更清楚的认识。

(一)25 kDa 造釉蛋白前体的初步降解

25 kDa 造釉蛋白前体降解的第一步发生在牙釉质的外层，主要是蛋白分子 C 端的降解。有学者分离提纯了牛和猪的造釉蛋白分子并进行了蛋白序列分析，发现其与造釉蛋白前体相比缺乏 C 端最后 12 个氨基酸残基，分析认为可能是其前体 C 端降解的结果。这两种生物的造釉蛋白经过这一降解产生的新的 C 端均含有原前体的最后一个色氨酸残基。目前尚不清楚造釉蛋白前体的端肽，是经过这一过程即已被完整切除，或是还需在后续步骤中通过外肽酶的作用去除。但无论是哪种情况，都可以简要地概括，由 173 个氨基酸残基所组成的猪的 25 kDa 造釉蛋白前体，经过这一步骤被降解为含有 161 个氨基酸残基的 23 kDa 的造釉蛋白分子。

除了 25 kDa 造釉蛋白前体和 23 kDa 的造釉蛋白外，在分泌期的牙釉质表面还含有一种 20 kDa的造釉蛋白分子，由 25 kDa 造釉蛋白前体的 1～148 位氨基酸残基组成。这种蛋白分子与前两种相比具有一个明显的区别，前两种蛋白分子随着釉质发育和釉质厚度的增加，在组织中的含量均逐渐减少，呈现一种一过性的表现；而这种 20 kDa 的蛋白分子却与之相反，随着釉质厚度的增加其含量亦随之增加，并在釉质基质中聚集和稳定表达。提示 20 kDa 蛋白分子可

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

能在釉质发育的全过程中起着较为重要的作用。

这种 20 kDa 的蛋白分子可能主要通过两种途径产生，一是由 25 kDa 造釉蛋白前体切除端肽片段直接产生，也可以由 25 kDa 造釉蛋白前体先降解为 23 kDa 分子，再经外肽酶酶切得到。不同种属的 20 kDa 蛋白分子的生成途径可能有一定区别，目前尚未完全明确各种不同生物种属的具体降解途径。过去认为小鼠中主要是通过第一种途径生成 20 kDa 造釉蛋白分子，但最近也有报道认为小鼠的该蛋白的生成可能由第三种途径，即通过 mRNA 的可变剪切产生。

有研究表明，在以上途径中，主要有两种蛋白酶参与了介导 25 kDa 造釉蛋白前体降解为 23 kDa 和 20 kDa 造釉蛋白的过程，其分子量分别为 76 kDa 和 78 kDa，均主要表达于分泌期牙釉质的表层，与造釉蛋白降解的活跃区相一致。在体外对降解过程的研究中，用 25 kDa 造釉蛋白前体作为这两种酶的作用底物，发现 76 kDa 蛋白水解酶具有较高的酶活性，能将 25 kDa 造釉蛋白前体水解为三种降解产物：23 kDa 和 20 kDa 造釉蛋白以及极少量的 21 kDa 造釉蛋白。其中 20 kDa 的造釉蛋白分子含量最高且稳定表达，含有 25 kDa 造釉蛋白前体 N 端的主要氨基酸序列，显然是这一酶解过程的主要产物。23 kDa 的造釉蛋白的存在证明 76 kDa 和 78 kDa 的蛋白水解酶可能与前面提到的 25 kDa 造釉蛋白前体的初步降解有关。痕量 21 kDa 蛋白分子的性质及意义目前尚不明确。

(二)20 kDa 造釉蛋白的降解

如前所述，20kDa 造釉蛋白在釉质发育分泌期大量聚集，也间接说明它的进一步分解可能相对缓慢，这是与其前体——25 kDa 造釉蛋白前体的初步降解的一个明显区别。在体内，20 kDa造釉蛋白的裂解位点在 45 位和 46 位氨基酸残基（色氨酸和亮氨酸）之间。其裂解产物主要有两种，一是分子量为 5 kDa 的富酪氨酸造釉蛋白多肽（tyrosine – rich amelogenin peptide, TRAP），由 45 个氨基酸残基组成，起止氨基酸残基分别为蛋氨酸和色氨酸；另一产物的分子量为13 kDa，包括了其前体的 46 位至 148 位氨基酸残基。这两种分子在溶解性上有较大区别，TRAP 与其他大部分来源于造釉蛋白的分子一样，是相对难溶性分子，而这种分子量为 13 kDa 分子通常为易溶蛋白，在体外能溶解于中性水溶液，或离子强度与分泌期釉质组织液相近的其他溶液中。因此，13 kDa 蛋白分子往往是研究者在这一时期的釉质组织液中能检测到的最主要的造釉蛋白成分。在体外实验中，只需将分泌期牙釉质离心，而不需任何蛋白溶解处理，就可以制备 13 kDa 蛋白的溶液，说明该蛋白成分主要是以游离分子的形式存在，而没有和釉质中的矿物成分或其他有机基质结合。

研究认为，这种裂解为 5 kDa 的 TRAP 和 13 kDa 蛋白的途径，是体内 20 kDa 造釉蛋白降解的主要途径，这一通路通常在微碱性的条件下进行，这与牙釉质发育过程中的基本内环境是一致的。在牙釉质发育过程中的少数情况下，内环境的 pH 有一定的波动，当 pH 略为偏酸性时，则 20 kDa 造釉蛋白分解的另一旁路激活。酶解的位点移至 62～63 位氨基酸残基（组氨酸和丙氨酸）之间，其主要蛋白产物是包含其前体 63～148 位氨基酸残基的一种 11 kDa 的分子。这一旁路在体外实验中已经得到了证实，被认为是牙釉质发育对内环境酸碱度变化的一种重要适应机制。

为了比较这两种裂解通路在体内牙釉质发育过程中的主次关系，有学者用 SDS – PAGE 方法检测了牙釉质发育中可溶性蛋白的表达。当采用常规电泳方法时，发现 13 kDa 和 11 kDa 的蛋白均能检测到，且电泳条带的强度相近，似乎说明 11 kDa 蛋白在发育中也有高强度的表达；但采用分辨率更高的 Tricine 电泳系统重复上述实验，发现前一实验中所谓的 11 kDa 蛋白区

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

域，实际是由至少三种分子量不同的蛋白条带重叠所致，其强度均低于 13 kDa 条带。说明生理状况下，45 位和 46 位氨基酸残基（色氨酸和亮氨酸）之间是 20 kDa 造釉蛋白酶解的主要位点，其主要降解产物是 13 kDa 的可溶性蛋白。

关于 11 kDa 和 13 kDa 的可溶性蛋白的最终去向现在还未完全明确。有学者认为造釉细胞除了分泌功能外，还具有一定的吸收功能，最终可能再将这些弥散的可溶性蛋白分子吸收。

而 TRAP 作为一种难溶性的蛋白，最终可能进一步降解为更低分子量的分子，如图 3－3 所示。有研究者报道，在牛的牙釉质中可成功分离到分子量为 4.5 kDa、4.3 kDa、3 kDa 的蛋白分子，且其氨基酸序列也与 TRAP 一致。说明 TRAP 最终从牙釉质中消除前，它可能被裂解为分子量为 4.5 kDa、4.3 kDa、3 kDa 的小分子片段。

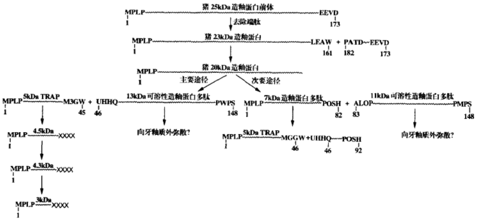


图 3－3　造釉蛋白前体降解模式图

（三）23 kDa 造釉蛋白的降解旁路

在研究中发现，除了前文提到的各种途径产生的造釉蛋白降解产物外，在牙釉质发育过程中还发现了一些无法用上述代谢途径解释的降解产物。例如，采用排阻层析技术（exclusion chromatography）分析小牛牙釉质在发育过程中的氨基酸组成，结果发现了一些与已知的造釉蛋白降解产物相去甚远的蛋白分子，其中脯氨酸含量高达氨基酸残基总量的 352‰，而高度缺乏色氨酸（仅为 1.7‰）。众所周知，由于造釉蛋白中色氨酸主要集中于蛋白分子的 N 端，而 C 端高度缺乏色氨酸，因此可以推断这些新发现的片段可能是造釉蛋白 C 端分解的产物，故在氨基酸组成和结构上和本文前面提到的各种途径中以 N 端裂解为主所分解的片段有所不同。此外，还有学者从小牛牙釉质中分离到了两种多肽链，即 A2 肽和 B1 肽，分别对应着小牛牙釉质 23 kDa 造釉蛋白的 C 端端肽的部分序列，分别为 95～185 位氨基酸残基（丝氨酸至色氨酸）和 116～185 氨基酸残基（丝氨酸至色氨酸），如图 3－4 所示。这两种多肽的氨基酸组成与前面用排阻层析法发现的肽链相似（如图 3－5 所示），证实了 23 kDa 造釉蛋白确实可能通过其他代谢途径生成了另一些降解产物。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

1 50
MPLPPHPGHPGYINFSYEVLTPLRWYQSMIRHPYPSYGYEPMGGWLHHQI

51 100
IPVVSQQTPQNHALQPHHHIPMVPAQQPVVPQQPMMPVPGQHSMTPTQHH
A2-SMTPTQHH

101 150
QPNLPLPAQQPFQPQSIQPQPHQPLQPHQPLQPMQPMQPLQPLQPLQPQP
QPNLPLPAQTPFQPQSIQPQPHQPLQ****************
B1-SIQPQPHQPLQPHQPLQPMQ***********

151 197
PVHPIQPLPPQPPLPPIFPMQPLPPMLPDLPLEAWPATDKTKREEVD
********************PLQAW
********************PLQAW

图3-4 A2/B1肽与25 kDa造釉蛋白氨基酸序列比较

带*标志为未测序部分

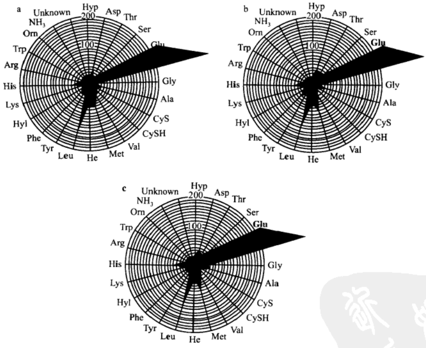


图3-5 A2肽(a)、B1肽(b)和小牛发育期釉质中未知肽链片段的氨基酸组成比较

有研究者从剪除端肽的23 kDa造釉蛋白中去除和上述A2、B1肽相关成分，发现所得到的产物与在检测到的另一些裂解片段吻合。例如，同样采用凝胶排阻层析法，有学者在牛釉质中

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

检测到分子量分别为 15 kDa 和 12.5 kDa 的两种多肽分子，合称为 D 肽。分别将 D 肽以及 23 kDa 造釉蛋白去除 A2 肽或 B1 肽后的 N 端进行氨基酸组成分析和测序，发现二者非常相似；或者将 A2 肽或 B1 肽的氨基酸组成和 D 肽的氨基酸组成相加，所得的氨基酸组成几乎就是 23 kDa 造釉蛋白的理论氨基酸组成，如图 3 - 6 所示。这两组实验都有力地说明了 23 kDa 造釉蛋白除了经典的 N 端分解途径外，可能在某些条件下，还通过一些替代旁路分解生成类似于 A2、B1 肽和 D 肽这两类 C 端分解产物。

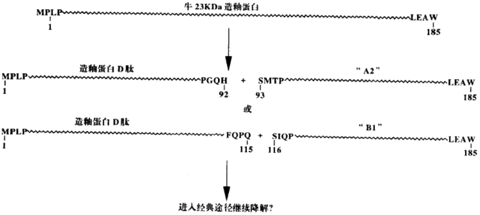


图 3 - 6　造釉蛋白降解旁路示意图

最后要讨论的是 A2、B1 肽和 D 肽这两类 C 端分解产物的最终代谢途径。尽管目前对其还不完全明了，但由于经过这一途径得到的分解产物，如 D 肽仍然含有经典途径中提到的色氨酸—亮氨酸(45 ~ 46 位氨基酸残基)位点，因此可以推测，D 肽仍然可以进一步在该位点酶解，生成前述的 TRAP。而 TRAP 再继续降解为更小分子的多肽片段，如图 3 - 7 所示。应该注意的是，一旦进入 C 端分解并生成了 D 肽，就不会再进入生成 20 kDa 和 13 kDa 的通路。因此，我们认为，这种 C 端分解途径和前面提到的经典的 20 kDa - 13 kDa 造釉蛋白分解途径，是两种完全不同的 23 kDa 造釉蛋白的分解代谢途径。但目前尚不知道是什么因素决定生物体内这两种通路的关闭和调节，还有待于进一步对可能影响这一过程的因素进行更深入的研究。

(四)造釉蛋白可变剪切产物的降解

由于经 mRNA 可变剪切产生的造釉蛋白在总的造釉蛋白中含量很低，因此针对这些蛋白所作的研究也相对较少，但从现有的一些研究中，也可以发现这类蛋白在其降解代谢的方式上，和前面提到的还是有一定的区别。如前所述，LRAP 是在猪的牙釉质发育中造釉蛋白可变剪切的典型例子，有研究者以它为例研究了经可变剪切的造釉蛋白的降解模式。研究者从猪釉质中分别分离纯化了完整的 LRAP 和切除了端肽的 LRAP，并比较二者氨基酸序列的区别。结果发现，在未经可变剪切的 25 kDa 造釉蛋白前体中是剪除了 C 端 12 个氨基酸残基得到去端肽的蛋白，而 LRAP 的去端肽过程仅去除了 C 端 11 个氨基酸残基，或者是去除了 C 端 16 个氨基酸残基，这一过程如图 3 - 8 所示。但究竟后者是 LRAP 一步去除 16 个氨基酸残基，还是先去除 11 个氨基酸残基，再被其他酶作用切除其余 5 个残基，目前尚不清楚。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

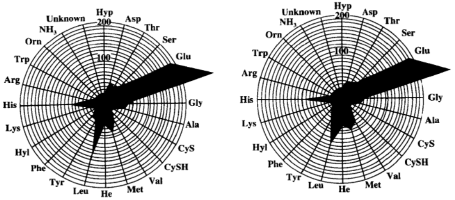


图 3－7　D 肽与去端肽 23 kDa 造釉蛋白氨基酸组成关系

图 a 示排阻层析所得多肽片段和 D 肽氨基酸组成之和；图 b 示去端肽得 23 kDa 造釉蛋白氨基酸组成，与图(a)相近

未去端肽的猪 LRAP(56 氨基酸残基)

MPLPPHPGHPGYINFSYEVLTPLKWYQNMIRHPSLLPDLPLEAWPATDKTKREEVD

1　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　56

去端肽后的猪 LRAP(45 氨基酸残基)

MPLPPHPGHPGYINFSYEVLTPLKWYQNMIRHPSLLPDLPLEAWP

1　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　　45

去端肽后的猪 LRAP(40 氨基酸残基)

MPLPPHPGHPGYINFSYEVLTPLKWYQNMIRHPSLLPDLP

1　　　　　　　　　　　　　　　　　　　40

图 3－8　猪牙釉质 LRAP 去端肽示意图

除此之外，LRAP 的进一步降解过程还未阐明，但可以推测，由于在转录过程中对外显子 6 的选择剪切的结果，本来由外显子 6 编码的一些酶切位点(如色氨酸—亮氨酸)消失，前述的一些降解通路自然也不存在了。

除 LRAP 这种外显子 6 的可变剪切产物之外，对其他一些外显子可变剪切的产物，端肽的去除同样是其胞外降解的第一步。其中，外显子 5 的可变剪切产物——18 kDa 的造釉蛋白，由于和前述的由 148 个氨基酸残基组成的 20 kDa 造釉蛋白具有相同的 C 端，因此可以推测二者在去端肽之后可能按同一途径继续降解。

在人类，若造釉蛋白基因转录过程中的可变剪切发生在外显子 7，其表达产物将含有一个由外显子编码的、14 个氨基酸残基组成的额外序列，这个额外序列中含有 1 个可以产生 TRAP 的酶切位点(色氨酸—亮氨酸)。如果在这个位点被酶切，产生的 TRAP 就比正常的 TRAP 多

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

14 个氨基酸残基，被称为变异 TRAP。目前这种 TRAP 在包括人类在内的多种种属还只是一种理论推测。但有研究者在金黄地鼠的发育期牙釉质中，分离到了与这种推测的变异 TRAP 在分子量和氨基酸组成上都相似的蛋白成分，如图 3－9 所示。但这种蛋白是否存在于人类及其意义尚不明确。

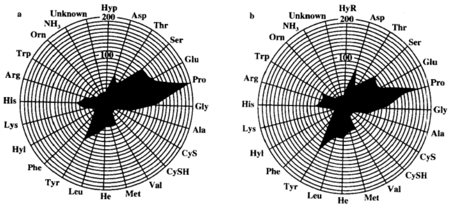


图 3－9　变异 TRAP 氨基酸组成示意图

图 a 为人类 TRAP 氨基酸组成（根据 cDNA 得出的理论推测），
图 b 为金黄地鼠变异 TRAP 氨基酸组成，二者有一定相似之处

六、造釉蛋白的功能

以上总结了造釉蛋白在牙釉质发育过程中的降解过程，在这一过程中生成了一系列的造釉蛋白降解产物。虽然在不同种属之间这一降解过程有所区别，但生成的降解产物在结构上却具有高度的保守性，例如相同的酶切位点、酶切途径等，说明这些蛋白分子在釉质发育过程中具有稳定的生物化学特性和一定的生理功能。

考虑到造釉蛋白降解过程的复杂性和其降解产物的多样化，可以推测，这样一种精细的过程绝不仅仅是将造釉蛋白分泌排除而为无机晶体的沉积和生长提供空间，而是具有更为复杂也更为重要的意义。事实上，酶谱分析表明，大鼠分泌期牙釉质中蛋白水解酶作用于造釉蛋白的分解片段，在聚丙烯酰胺凝胶上自由弥散，说明其活性并不足以将造釉蛋白分解为足够小的分子片段。这一发现提示，在釉质发育的分泌期，尽管蛋白水解酶的降解作用贯穿始终，但其作用并非将底物分解为无功能的小分子肽链或者是游离的氨基酸，而是在一种精细的调控机制下，将底物水解为若干具有相应功能的大分子物质，并暴露或掩蔽各自的作用基团，发挥其相应的作用。

虽然目前对这些分子具体的作用机制尚不明确，但体外实验的结果提示，25 kDa 的前体造釉蛋白能选择性地吸附到合成的羟磷灰石表面，从而抑制其继续生长；相反，25 kDa 的前体造釉蛋白的降解产物，如 23 kDa、20 kDa 和 13 kDa 造釉蛋白对羟磷灰石的吸附能力则下降，对后者的生长抑制也减弱。因此，通过对 25 kDa 的前体造釉蛋白水解过程的调控，实际上间接而

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

有效地调节了牙釉质中羟磷灰石晶体生长的速度。该生长方式称为侧向生长。这是造釉蛋白的第一个重要作用。

其二，除了上述被称为侧向生长的生长方式外，羟磷灰石的延长是釉质发育分泌期的重要特点，晶体的延长决定了釉质最终发育完成后的厚度。研究认为，上述造釉蛋白对羟磷灰石晶体侧向生长的抑制，同时保证了晶体延长所需的矿物离子。因此，上述造釉蛋白的降解在调节晶体侧向生长的同时也起到了调节晶体延长的速度的作用。同时，还有学者认为这一过程还避免了釉质表面晶体的不全矿化等。

从上述过程中可以发现，随着 25 kDa 的前体造釉蛋白的去端肽作用，其对羟磷灰石晶体的亲和力随之下降，这似乎提示端肽本身对矿物表面具有高亲和力。但在体外实验中，用游离氨基酸人工合成相应的端肽序列，却发现这一序列对矿物的亲和力并不高，说明并不是端肽本身具有高亲和力，而是具有完整端肽结构的整个前体造釉蛋白分子的整体结构、构象才具有这种对无机矿物质表面的高亲和力。

此外，由于端肽主要由一些亲水性氨基酸残基组成，因此端肽的存在使带有端肽结构的前体造釉蛋白具有一定的亲水性，从而使造釉蛋白前体的溶解性增加。这种溶解性能的增加，使其更易于在粗面内质网合成后向胞外基质转运，也有利于其在胞外基质中积聚为超大分子集合体。而 25 kDa 的前体造釉蛋白的去端肽降解过程，则可以通过去除端肽带来的亲水能力而调控这种超分子的形成。这种超分子形成的意义何在呢？有研究发现，在釉质发育过程中，往往在釉质晶体的周围可以观察到一些管状或网状的结构，而在相当于釉柱间质的位置则缺乏这种结构。故推测这些结构可能起到了赋予釉质晶体正确的生长方向和引导釉柱形成的作用。经氨基酸组成分析发现，这些结构的氨基酸组成和造釉蛋白非常接近，所以可以推测 25 kDa的前体造釉蛋白形成的这种超分子结构，可能就是这些引导釉柱生长的网状结构。因此，造釉蛋白的第三个作用可能就是引导釉质晶体生长和釉柱的形成。

一旦造釉细胞完成了从釉牙本质界的迁移，羟磷灰石晶体的延长也相应完成而进入了矿物质的沉积阶段。这一阶段，主要是使在上一阶段(分泌期)已初步形成的、但相对来说还较为薄弱的矿物晶体结构得到加强和成熟。该期的主要蛋白成分是 20 kDa 的造釉蛋白，其作用是在晶体成熟前作为其继续钙化时必要的支架，这是造釉蛋白的作用之四。

釉质晶体的延伸完成后，由于釉质晶体在生长过程中形成了足够强度的支撑网架结构，原来的网架——造釉蛋白则开始进一步分解为小分子片段，退出晶体结构，使羟磷灰石晶体获得更多的生长空间。这是造釉蛋白作用之五。

除此之外，造釉蛋白的分解还有更深层的意义。体外实验证明，造釉蛋白中的某些成分(包括完整的造釉蛋白前体及其有限酶解的大片段分子)都可能对羟磷灰石晶体的生长具有抑制作用，羟磷灰石晶体只在去除蛋白的环境下才能正常生长。而在釉质晶体的延伸完成后的酶解作用与前述的有限降解是不同的，它能将造釉蛋白及其相应的大分子片段彻底降解为小分子多肽甚至单个的氨基酸，从而彻底失去其蛋白活性和对羟磷灰石晶体生长的抑制能力。

总之，造釉蛋白在牙釉质的发育过程中发挥了重要作用，它能有效地调节牙釉质中羟磷灰石晶体生长的速度，包括侧向生长和轴向的延伸；能通过形成釉质晶体周围的蛋白网层引导釉质晶体生长方向和釉柱的形成；在羟磷灰石晶体成熟前作为其继续钙化时必要的支架；最后，通过彻底降解为羟磷灰石晶体的成熟提供更多的生长空间并解除对其抑制作用。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第二节　牙发育过程中的基因调控

牙齿的发育是一个复杂的过程，将发育为牙齿的两大类细胞——牙胚上皮细胞和间充质细胞的互相作用、互相诱导和调控贯穿了牙齿发育的全过程。这一过程，是一个完整的、没有截然分界的有机整体，其中始终存在着连续的，同时又是不断变化的基因调控过程。为理解方便，粗略地将此分为牙胚发育的启动、间充质凝聚区的形成和增殖，以及牙发育成形后期三个阶段来讨论。

一、牙胚发育的启动阶段

(一)神经嵴和口腔上皮的作用

近 10 年来，通过大量的体内和体外的重组研究，对牙胚发育早期的组织间相互作用已有了相当程度的了解。通过对两栖类动物胚胎的研究发现，牙胚间充质的来源是颅神经嵴，如果去除颅神经嵴，其第一鳃弓就不能正常发育。通过传统的分段切除—再植入的实验方法，现在已经确定了颅神经嵴中与第一鳃弓发育有关的区位。一系列的体内移植实验，证实了将颅神经嵴的特定部分移植于口腔上皮，可以诱导完全的牙胚发育过程。说明神经嵴和口腔上皮在牙齿发育中不可或缺的重要性。其实质，是来源于神经嵴的间充质细胞和口腔的外胚层上皮细胞，将是贯穿牙齿发育全过程的两个基本分化、发育的细胞来源，最终分别分化为牙本质和牙釉质。二者的相互作用及与牙齿发育的关系详见本书有关口腔胚胎发育的牙、颌、面相关章节。为了理解方便，在此简要总结为图 3－10。

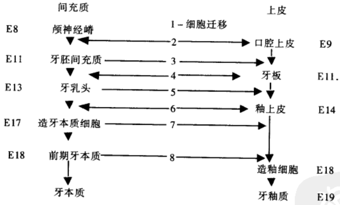


图 3－10　牙胚发育过程中上皮与间充质相互诱导作用示意图

图中 E 表示胚胎发育的天数，1，2...8 示人为划分的胚胎发育阶段

(二)间充质—上皮相互作用的意义

在牙胚发育的早期，一些由牙胚上皮向间充质传递的信号是使间充质中具有造牙本质潜能的细胞分化的关键因素。例如，胚胎发育的头 12 天，来源于下颌弓的具有造牙功能的上皮

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

细胞在分化的同时，通过分泌一些细胞因子作用于间充质细胞，使得一些来源于神经嵴的原本不具有造牙潜力的细胞分化，并开始形成牙乳头。相反，在体外的重组实验中，在胚胎发育的12天以后，牙胚中的间充质细胞移植于一些非牙源性上皮，也能诱导后者向造牙性分化。这些现象说明在胚胎发育的早期，牙源性上皮和间充质之间的相互诱导，对彼此启动造牙分化的过程，是必不可少的。

尽管牙源性上皮和间充质细胞之间是一种相互诱导的关系，但在牙胚发育的不同阶段，二者的主次关系是有区别的。现在已经知道，在开始阶段，造牙中心主要存在于牙源性上皮中，由其分泌信号因子诱导来源于神经嵴的间充质细胞，继发性地分化出造牙前体细胞。这一过程，在胚胎发育中相当于11.5天，伴随着口腔上皮的增厚和牙板的形成。而在胚胎发育的14、15、16天，即帽状期和钟状期，造牙中心又逐渐向由间充质层分化而来的牙乳头转移，而牙源性上皮则更多地成为一种调控部位。但是，无论牙源性上皮和间充质细胞中谁起主导作用，都不能单独诱导牙齿的形成，这是因为在全过程中二者都需要对方通过各种复杂的反馈机制提供的必要的调控信号，这在后面将具体地讨论到。

从分化的最终结果看，间充质中的牙胚乳头将分化为能分泌牙本质的造牙本质细胞，间充质层的牙滤泡将分化为牙槽骨和牙周韧带，内层釉上皮成为分泌牙釉质的造釉细胞。直到这些后期分化成形的过程中，造釉细胞（来源于牙源性上皮）和造牙本质细胞（来源于间充质细胞）依然继续着其在早期发育中的相互诱导和相互调控关系。

综上所述，大量的经典的实验不仅证实了牙齿的最早来源是胚胎口腔上皮和来源于神经嵴的间充质层，而且也揭示了二者之间的信号分子的交换贯穿了牙齿发育的全过程。在下面，我们将具体地讨论一些参与这一过程的信号分子，以及它们在牙胚发育过程中随时相改变的规律和其基因调控机制。

（三）参与牙胚发育调控的信号分子

参与牙胚发育的因子主要有：①来源于外胚层的信号分子：转化生长因子－β（transforming growth factor β，TGF－β），骨形成蛋白（bone morphogenetic proteins，BMP），成纤维生长因子（fibroblast growth factors，FGFs）；②转录因子：Msx1，Msx2，Msx3等；③结构蛋白：多配体聚糖（syndecan），腱生蛋白（tenascin）等。

1．*外胚层信号分子* 近来，研究者发现在脊椎动物的发育过程中，保留了低等生物——果蝇的发育中的一些基因调控方式，其中一个共同的重要之处是，一些由外胚层细胞分泌的生长因子都在发育过程中发挥了重要的调控作用。这些信号分子包括了WNT家族、转化生长因子家族等，而后者包括骨形成蛋白、成纤维生长因子等。

（1）骨形成蛋白：骨形成蛋白属于TGF－β超家族。目前已知，BMP家族至少有15个成员，其中8个成员已在哺乳动物中确认并克隆成功。根据其氨基酸序列的同源性，又主要分为BMP2、BMP4、BMP7等3个亚群。而且，由于不同亚群的BMP分子可以杂合体的形式（如BMP2/7）存在，更进一步增加了BMP家族的多样性。

关于骨形成蛋白与牙胚、面突及骨发育关系的研究主要源于以下发现：①BMP基因序列高度保守，BMP在人和一些低等动物中的同源性相当高，BMP2和BMP4与果蝇的dpp基因具有75%的同源性，而BMP2和BMP4彼此的同源性高达95%。②果蝇的dpp基因在其发育过程中，是一种重要的上皮—间充质信号分子，它的缺失通常可以造成果蝇的发育畸形。而哺乳动物的BMP4可以补救果蝇体内由于dpp基因突变而发生的畸形；相反，有人曾将果蝇的dpp

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

植入哺乳动物体内，发现可以在哺乳动物体内诱导新骨形成。

这些证据说明，BMP在进化过程中高度保守。一般说来，生物进化的历程有高度的重复性，即单个生物个体的发育过程在一定程度上重复了生物的进化史。因此，可以推测在生物进化发育过程中，具有高度保守性的基因应该在生物个体的发育中发挥一定作用。人们认为BMP在胚胎发育中的作用可能也十分重要。事实也确实如此，最新的研究表明，BMP在眼、肾、头发、肢体、心脏、牙胚、面突、骨筋、神经系统及造血系统等多种组织和器官的发育中都有表达。

Heikinheimor通过原位杂交发现，牙胚发育早期，在间充质细胞的聚集过程中有BMP4和BMP2 mRNA的表达，但BMP2 mRNA出现时间相对较晚。从表达的部位分布看，BMP4和BMP2主要存在于未分化的造牙本质细胞中；BMP6则表达在早期的牙上皮中，以后出现在前期造牙本质细胞和造牙本质细胞中，而且，BMP6在牙本质形成的整个过程中都有表达。因此，BMP4参与牙胚的早期发育，BMP6在控制细胞分化的上皮—间充质相互作用中发挥作用，BMP2和BMP6参与造牙本质细胞的分泌功能。Thesleff的报道略有不同，他认为BMP4和BMP2出现的时间都比较早，而且都表达于早期牙上皮。

Nakashima等对BMP表达时间的报道与Heikiheimor的报道大致相同。在培养的牛牙髓细胞，BMP4 mRNA在第14天有表达，BMP2 mRNA在第28天有表达。BMP4出现的时间与纤连素、Ⅰ型和Ⅱ型胶原mRNA表达增加的时间相同。BMP2出现的时间与骨钙素出现的时间相同，说明BMP4可上调Ⅰ型和Ⅱ型胶原mRNA的表达，BMP2可增加骨钙素的合成。Takeda等用Northern印迹检测原代培养的牙髓细胞，发现在牙髓细胞中BMP2、BMP4、BMP6都有表达，BMP在牙髓细胞中的表达是牙髓细胞具有诱骨活性的原因之一。

在鸡胚的面突发育过程中，面突始基远端的散在区域有BMP2和BMP4的表达。在口周组织的形成过程中，用^{35}S标记BMPs cDNA探针，可检测到在鼠胚发育的第9.5天面突的上皮中有BMP4 mRNA的表达，随后表达迅速下降，在第10.5天和第11.5天几乎无表达。但在第13.5天，又有BMP4 mRNA的表达，此时BMP4的表达局限于牙板、滤泡和牙乳头中。BMP2 mRNA则要等到第13.5天才出现，主要表达区域在口底和舌腹部。

鳃器官发育过程中，在形成鳃裂的区域有散在的BMP7的转录，随后，在鳃裂和鳃弓中都可以检测到，其中包括第二鳃弓的外胚层边缘区。鳃器官发育的后期，在第二鳃弓的外胚层边缘区亦有BMP7和FGF8的表达，在鳃弓的远端末梢有BMP4的转录。

另外，在人牙胚发育和鸡胚的鳃弓发育中有BMP7和BMP3的转录。Dijke等还分离出了鼠和人的BMP2和BMP4受体的cDNA，并通过原位杂交测得BMP2和BMP4的受体在鼠胚第13.5天的牙胚中有表达，且所表达的范围大于BMP2和BMP4的表达范围。

可以看出，无论是在牙胚发育还是在面突发育中，BMP4的出现都最早，在面突发育中BMP2的出现亦比较早，继之是BMP6，BMP3，BMP7。BMP2在口腔粘膜上皮的发育中也有重要作用。因此，BMP4在启动牙胚和面突发育中都有重要作用。

在Thesleff的研究中，她将50～100 μ的琼脂糖小球分为两组，一组用重组BMP4浸润，另一组用小牛血清浸泡，然后分别植入经显微解剖分离的牙胚间充质中，培养24小时。发现在植入BMP4浸润的琼脂糖小球的间充质周围出现明显的透明环，而作为对照的则没有明显改变。这种透明环的出现提示了间充质中分泌的细胞外基质改变。经分析，这些基质包括了一些转录因子Msx1、Msx2等一些与牙胚发育相关的细胞因子，说明BMP4在牙胚发育的间充质

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

诱导中起到了重要作用。

(2)成纤维生长因子:FGF 是成纤维细胞生长因子,包括 FGF 1～8 用 Pax－9 作为标志物,可检测到在牙胚发育期间的间充质细胞中有 FGF8 的表达,说明 FGF8 亦参与牙胚的发育。FGF8 对可形成下颌骨的间充质细胞起诱导作用,而 BMP2 和 BMP4 则起抑制作用。在牙胚发育中 FGF8 对 BMP2、BMP4 有拮抗作用。在鸡胚发育的早期,FGF8 表达的范围十分广泛,以后表达在第二鳃弓外胚层的边缘区。

2.转录调控因子

(1)Msx 基因:Msx 基因属于鼠的同源框(homebox)家族基因,其基因序列也高度保守,从原始的腔肠动物到哺乳动物都有表达。迄今在哺乳动物中发现有 3 种 Msx 基因,即 Msx1、Msx2 和 Msx3。

对脊椎动物胚胎的研究发现,Msx1 和 Msx2 都是首先表达于中胚层的背神经管,相当于心前区的位置。在妊娠中期,Msx1 和 Msx2 的表达见于包括发育中的切牙和磨牙牙胚在内的几乎所有上皮——间充质细胞界面。

原位杂交实验揭示,鼠胚中 Msx1 和 Msx2 的表达与牙胚发育的阶段性一致。Msx2 首先在牙胚发育的 10.5 天表达,作为牙胚发育的早期信号之一。在 11.5 天, Msx2 与 Msx1 则共同表达于牙胚间充质中。但 Msx1 的表达广泛分布于下颌间充质,并呈现由近中向远中递减的趋势,而 Msx2 的表达则局限于将来牙形成的区域。范围远小于 Msx1 的表达区域。进一步的研究发现,Msx2 仅表达于发育更为充分的磨牙牙胚颊侧面,它的这种在磨牙上皮细胞和间充质细胞中的早期表达,与其在牙裂中的缺失形成明显的对比,说明在牙胚发育早期 Msx2 表达范围的局限性。但应注意到,Msx1 和 Msx2 表达的这种规律不是一成不变的,随着牙胚的发育,其表达强度、部位均出现相应的改变。

对 Msx 基因在牙胚发育中的重要作用的认识,来源于对几种 Msx 基因缺陷型小鼠的研究。Msx1 缺陷型小鼠的蕾状期发育延迟,在这种缺陷型小鼠中加入 BMP, 可使牙胚发育由 13.5 天蕾状期进入 14.5 天的帽状期。Msx2 基因缺陷型小鼠,在牙胚发育后期才出现牙胚畸形。用反义核酸封闭 Msx 基因,所得的结果与上述结果不尽相同。封闭 Msx1 基因后,小鼠在发育过程中产生上颌突、下颌突、额鼻突的畸形;封闭 Msx2 所产生的畸形与封闭 Msx1 相似,只是畸形数量更多,程度更严重。

对 Msx 基因表达的研究不多。Neubuser 等报道 Msx1、Msx2 在神经管、神经嵴和颅面发育的各个重要时期都有表达。早期的表达部位主要在间充质,上皮中较少。后期主要在上皮中。Msx 的转录不依赖于胚层之间的相互作用,而是依赖于细胞与细胞之间,细胞与基质之间的相互作用。

(2)Lef1 基因:Lef1 基因即淋巴样增强因子 1(lymphoid enhancer factor 1,Lef1)是 HMG 家族一员,是一种 DNA 结合蛋白,下含 3 个不同亚群,共同的特点是均有一个由 85 个氨基酸残基组成的 DNA 结合位点。这些蛋白本身虽然不能直接促进转录合成,但通过与 DNA 结合后改变 DNA 的构象,使其易于与其他转录因子(如 Msx 等)结合,而间接起到促进转录的作用。现在的研究发现,在妊娠中期鼠胚的牙胚间充质凝聚区的间充质细胞中有高浓度的Lef1表达,而通过反义核酸技术阻断 Lef1 功能,则能诱导出包括磨牙、切牙及牙槽骨缺失在内的多种畸形。更为精确的原位杂交和免疫组织化学技术检测发现,Lef1 主要表达于牙胚帽状期的牙乳头中,少量见于牙源性上皮中,而这些区域与 Msx1 和 Msx2 表达区域重叠。提示 Lef1 在牙胚发育中

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

的作用机制可能与传递及调控转录因子 Msx1 和 Msx2 的作用强度有关。

3.其他间充质来源的细胞因子

(1)活化素 βA 基因:最近的一项研究发现,在活化素 βA 基因缺陷型小鼠中,出现牙齿发育的停滞和先天性唇腭裂,通常是切牙、下颌磨牙及下颌牙槽嵴缺失。但目前该基因的具体作用时相还不明确。

(2)Dlx 基因:与果蝇的短足基因同源的 Dlx 基因家族,在人类至少包括了 6 种不同的基因,其中有几种因为与前面提到的 Msx 基因关系密切而引起了人们的关注。例如,Dlx1 和 Dlx2 在胚胎发育的 12~14 天在牙胚上皮和间充质中表达,且表达量与同期间充质细胞中 Msx 和上皮中 Msx2 的表达相关。而 Dlx3 则在牙蕾间充质中表达,也与 Msx 基因相关。虽然在 Dlx2 缺陷的小鼠中未发现明显的牙发育异常,但研究者猜测在 Dlx1 和 Dlx2 同时突变的情况下,可能出现磨牙牙胚发育的异常。目前有人正致力于该基因与 Msx 基因之间相互作用的研究。

(3)Pax 基因:哺乳类动物 Pax 基因家族由 9 个不同的基因组成,其共同特点是具有一个 128 个氨基酸残基组成的 DNA 结合位点。由于编码该位点的碱基序列与果蝇的配对基因同源,因此称为配对位点。根据这 9 种 Pax 基因彼此碱基序列的同源性和表达的特征,可以划分为若干组。Pax1 和 Pax9 与牙胚发育关系较为密切。研究发现在 Pax1 缺陷的小鼠中,将出现颅面部发育的异常和其他一些骨关节病,因此有研究者推测 Pax1 及 Pax9 可能在牙胚发育中有一定作用。尽管采用原位杂交方法没有在 11.5 天到 13.5 天的磨牙牙胚中检测到 Pax 的表达,但最近有人报道,在胚胎发育的 14.5 天,在间充质细胞中检测到 Pax9 的高浓度表达。而且,有人观察到 Pax9 缺陷小鼠出现的磨牙发育异常,与 Msx1 基因缺失的表现相似,提示 Pax 在牙胚发育中的作用值得研究。

(4)速激肽:位于哺乳动物中枢神经系统中的速激肽,包括神经递质和神经调节多肽,由 5 种不同的多肽组成。其中 4 种,包括 P 物质、神经激肽 A 及其 2 种衍生物均来源于同一种蛋白前体,该前体称为前速激肽原 - A(preprotachykinin - A,PPT - A)。生理状况下,这些多肽可以被位于细胞表面的一种神经多肽水解酶清除,后者称为中性内肽酶(neutral endo - peptidase,NEP)。研究发现,从牙胚蕾状期到牙胚帽状期后期,牙胚间充质中都有 PPT - A 和 NEP 的表达,而在钟状期消失。这种表达特点与 Msx 基因的表达有类似之处。速激肽的受体,即 NK - 1 在胚胎发育的 13~16 天在牙胚中也出现表达。实验中发现采用 PPT - 1 的反义寡核苷酸或 NK - 1 拮抗剂阻断后,牙胚发育停滞,说明速激肽可能是牙胚发育过程中一种必要的信号分子。

4.细胞因子的相互作用　在牙胚发育过程中,上皮—间充质之间的相互作用可调节其形态的发生和细胞的分化。上皮—间充质的相互诱导是有序的,由一系列细胞反应事件组成。在早期的牙胚发育中,上述各种因子的表达都受上皮—间充质相互作用的影响,主要表现为牙上皮诱导间充质聚集区的细胞因子,如 BMPs, Msxs, FGFs,腱生蛋白的表达,受上皮诱导之后,这些因子的表达量升高,此时,上皮的信号就转移到间充质中。

越来越多的证据表明,BMP 是上皮—间充质之间的一种信号分子,可以调节多种细胞因子的表达,BMP4 是目前公认的信号分子,它产生于早期的牙上皮中,可以调节间充质中细胞因子的表达,通过这个过程来启动牙胚发育的级联反应。其主要作用有:①BMP4 可激活 Msx1,Msx2,Msx3 的表达。②BMP2 和 BMP4 可激活面突始基发育中的 Msx1 和 Msx2 的表达。③在 Msx1 的存在下,BMP4 可诱导自身在间充质中的表达。④ BMP4 可诱导 Lef1 的表达。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

BMP2 虽然也表达在牙上皮，但它是否由牙上皮产生，是否具有启动作用还不清楚。BMP4 和 Msx1 及 Lef1 的相互作用，如 BMP4 的表达从上皮转移至间充质，以及 Lef1 的表达需要 Msx1。Msx1 和 Msx2 表达升高后，FGF 可诱导间充质中多配体聚糖－1 的表达，通过多配体聚糖－1 和腱生蛋白结合和相互作用来启动间充质凝聚区的形成。多配体聚糖－1 和腱生蛋白是配体和受体的关系，这两种物质结合之后，可使细胞之间的粘附发生改变，使细胞外基质重新塑形，有助于间充质聚集区的形成和上皮形态的发生。Msx1 被 BMP4 激活后，也可使 FGF4 的表达区扩大，而 FGF4 又可进一步促进间充质细胞的聚集。Msx，BMP4，Lef1 的表达量增加使未分化的间充质细胞聚集、分裂，形成高密度的细胞区。这些高密度的细胞区就是将来牙胚和面突的雏形。另有报道，Msx1 基因的活化与麦克尔软骨的分叉有关，BMP2 使始基骨中的细胞增生。因此，这些因子与面突的发育关系十分密切。

概括说来，上皮—间充质相互作用的机制是：上皮中首先产生一些信号分子，如 BMP4，这些信号分子可以使间充质中细胞因子的表达发生变化，这些生长因子表达量的变化，使细胞与细胞之间、细胞表面的粘附分子与细胞基质之间相互作用，从而调节间充质细胞的发育，使间充质细胞形成聚集区，促使其向不同的方向分化。这样，牙上皮中的信号就转移到间充质中。反过来，间充质中生长因子的变化又可以作用于上皮，促进上皮的发育。这样，通过上皮—间充质的相互作用，上皮和间充质都得到进一步的发育，为将来形成各种组织和器官奠定了基础。

二、间充质凝聚区的形成和增殖

(一)细胞外基质及其受体的作用

牙齿发育的形态形成和分化是上皮细胞和间充质细胞相互作用的结果。而细胞外基质(extracellular matrix，ECM)是这种相互作用中重要的物质。如果细胞外基质中的某些成分如胶原、蛋白多糖等异常，那么牙胚的形态发育和细胞分化均不可能进行。在体外实验中，用相应的诱导剂作用，刺激产生相应的 ECM，从而可以研究 ECM 的作用。下面，我们主要讨论在牙胚发育过程中的 ECM 的主要成分有哪些，它们对其受体如何进行调节，以及这些细胞外基质分子通过什么途径，作用于前面提到的来源于外胚层的信号分子，以及 Msx 等转录因子。

在牙齿发育过程中，上皮细胞基底膜主要含有胶原Ⅰ、胶原Ⅲ和胶原Ⅳ，以及层粘蛋白和各种蛋白多糖等。纤连蛋白的表达也可见于基底膜、间充质细胞和前期牙本质凝聚区，而在终末分化的造牙本质细胞中不再表达。相类似，前胶原Ⅲ的表达也是出现在基底膜和牙间充质中，而随着间充质细胞分化为造牙本质细胞而减弱。另一方面，胶原Ⅰ在牙间充质细胞中低浓度表达，而在牙发育的后期即前期牙本质形成和生物矿化的过程中出现高强度表达。以上这些分子在基底膜成分的协调下的共同作用，调节着间充质细胞向造牙本质和造牙釉质细胞分化。

近来，通过对牙发育过程中，间充质细胞和上皮细胞中细胞外基质成分的研究发现，整合素的 α_v 和 β_5 亚单位呈现一定的规律性变化。在牙发育成型的早期，α_v 主要表达于牙间充质细胞中，以后随着牙齿的发育主要表达于内层的牙釉质上皮细胞中；而 β_5 亚单位呈现相类似的表达特征。一般情况下，α_v 和 β_5 亚单位以复合体的形式存在，并与纤连蛋白的功能调节有关。因此，有人认为整合素 α_v 和 β_5 亚单位的复合体 $\alpha_v\beta_5$，通过与纤连蛋白的相互作用，而可能在牙发育的早期起到了重要作用。从组织学的观察发现，纤连蛋白的表达主要局限于牙胚乳

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

头和极化的造牙本质细胞中，而整合素 $\alpha_v\beta_5$ 的主要定位则随着牙胚帽状期的变化而改变。因此可以推测，牙胚发育过程中由纤连蛋白所诱导的细胞粘附不是靠配体的改变，而主要由受体表达水平的改变来调节。

体外的功能研究发现，基底膜的完整性是牙胚上皮发育成型的先决条件。例如，在体外培养牙胚上皮细胞和间充质细胞，通过电子显微镜观察发现，要使后者能分化为造牙本质细胞，则间充质细胞与基底膜的直接接触是必须条件。在这种上皮— 间充质细胞的相互作用中，上皮基底膜随着细胞外基质的改变而不断地改建。在其他一些器官的发育中发现，上皮基底膜的完整性和调控功能的发挥，依赖于一些金属基质蛋白降解酶的作用。例如，观察发现，当牙尖形成后，随着基底膜的部分降解，可以检测到明胶酶的大量增加，而已知明胶酶是一种明确且作用广泛的基质降解酶，说明在牙齿发育过程中，随着发育进程，基底膜也存在由明胶酶等基质降解酶介导的基底膜改建，以发挥基底膜在不同阶段的不同调控作用。在这一过程中，细胞外基质的变化主要是一些受体——配体的变化，细胞表面表达一些与此相关的细胞外基质分子的受体，如整合素、细胞外蛋白多糖、糖氨基转移酶等。其中，多配体聚糖是牙发育过程中一种重要的分子，特别是在 Msx1 基因突变或缺失的个体中作用巨大，可能是一种替代通路。

多配体聚糖－1 是一种最早在哺乳动物上皮细胞上发现的细胞表面蛋白多糖，它同时包含有类肝素位点和硫酸软骨素位点，而这两种物质均是细胞外基质的重要成分。从分子结构上看，多配体聚糖主要由 3 部分组成：①细胞外部分，能在蛋白溶解作用下从细胞表面释放而进入细胞外基质中；②跨膜区；③细胞内区，通过它与细胞骨架的肌动蛋白相连接。目前已经知道，小鼠的多配体聚糖的细胞外区可以与多种细胞外基质结合，包括胶原Ⅰ、胶原Ⅲ、胶原Ⅴ和纤连蛋白等。尽管现在已知的多配体聚糖家族成员至少包括了 3 种不同的多配体聚糖，但其中只有多配体聚糖－1 被认为与牙胚的发育有密切的关系。

在牙胚发育早期，多配体聚糖主要表达于第一下颌弓的立方状上皮细胞中，包括将来分化为牙胚上皮的区域，少部分表达于深层的间充质细胞中。免疫组织化学染色发现，随着牙齿发育过程中的上皮内陷，在牙蕾中出现多配体聚糖的高浓度表达，并且在其周围的间充质细胞中，多配体聚糖的表达也大为增加。此外，多配体聚糖在细胞外基质中的主要配体腱生蛋白在内陷上皮及其周围间充质细胞中的表达也相应增强。表明在此阶段多配体聚糖与牙上皮内陷过程中的分化调控，和间充质诱导有密切联系。亦可以说明为什么在这一阶段二者的表达突然大量增加。这种规律性改变及其意义，在肾脏发育过程中也可以观察到，并得到了佐证。稍有不同的是，在肾脏发育中多配体聚糖和其配体腱生蛋白的表达范围稍广，除了肾胚上皮和周围的间充质以外，在将来发育中与输尿管形成相关的输尿管胚蕾中也有表达。除这种分布范围的改变外，在牙胚发育过程中，多配体聚糖和配体腱生蛋白的表达，随着牙胚发育的进程还出现一定的时相改变，进入钟状期，多配体聚糖表达量下调并最终消失，而腱生蛋白的表达在帽状期暂时减少，但在钟状期又重新增加，并一直在造牙本质细胞分化过程中，表达于基底膜和牙萌出过程的牙髓中。

多配体聚糖的表达及其与其他细胞外基质成分的关系，亦通过体外培养进行了深入的研究。培养 24 小时后，牙胚上皮和间充质细胞的界面出现层粘连蛋白、Ⅲ型胶原和纤连蛋白的表达，提示在牙胚上皮和间充质细胞的相互作用下基底膜的初步形成。其中，Ⅲ型胶原和纤连蛋白弥散地分布于整个间充质层中，而并未完全聚集于间充质和上皮细胞界面。有趣的是，在体外实验中获得的多配体聚糖，只与Ⅰ型胶原和纤维连接蛋白结合，却不能与其在生理状态下

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

的配体腱生蛋白结合。但从早期牙胚中提取多配体聚糖，却能与包括腱生蛋白在内的几种细胞外基质结合。这可能是因为体内提取的多配体聚糖中保留了完整的硫酸肝素支链，而在体外培养条件下，硫酸肝素支链可能遭到了破坏。以上多配体聚糖在牙胚发育过程中的表达，和其与同期一些在牙胚发育中起重要作用的细胞外基质的能力，说明多配体聚糖可能通过与特定细胞外基质成分结合，并调节其活性，而在牙胚发育过程中起到重要作用。

1.牙间充质细胞中多配体聚糖的表达 为了进一步了解在牙胚发育过程中，牙胚上皮细胞诱发牙间充质细胞表达多配体聚糖的情况，Vainio 等设计了一系列体外实验进行研究。首先，在小鼠牙胚中用小鼠特异性的单克隆抗体封闭并标记其中的多配体聚糖抗原，并在抗体上桥联蛋白水解酶将多配体聚糖消化破坏，使其呈多配体聚糖阴性。然后，将小鼠牙胚中的间充质层和牙胚上皮分别分离后，离体培养，一段时间后再用免疫组织化学染色检测，均无多配体聚糖的表达。但如果将分离的间充质和牙胚上皮共同培养，结果发现在间充质层与上皮邻接处，出现较强的多配体聚糖阳性信号，而在其他区域仅有很弱的阳性反应。这一结果说明，间充质中需要来源于上皮细胞的信号分子的诱导，才能正常表达多配体聚糖。以后的实验又进一步研究了起诱导作用的信号分子，比如在分开培养的间充质中加入 BMP4(前文曾提到这种来源于外胚层的信号分子对间充质的诱导作用)共同培养，结果也不能诱导多配体聚糖的表达，说明 BMP4 不是多配体聚糖表达的诱生物质。现在的结论趋向间充质中多配体聚糖的表达需要来源于上皮的多种信号分子的协同作用。

但是，在上述实验的深入中，还观察到另外一种现象：将分离的牙胚上皮和间充质层灭活多配体聚糖后，先在体外共同培养 24 小时，然后再分别培养，结果发现在单独培养的间充质中仍然有多配体聚糖的表达，而且用 BrdU 检测细胞的增殖情况，发现在表达多配体聚糖的区域有较强的细胞增殖现象。该现象说明这些来源于上皮的多种信号分子，并非需要一直持续存在，在经过来源于上皮的信号分子的诱导后，间充质细胞在细胞分裂增殖的过程中，可将此信号放大并持续诱导多配体聚糖的表达。

2.信号分子对多配体聚糖表达的调控 尽管 BMP4 不能诱导间充质细胞表达多配体聚糖，但多配体聚糖的表达仍然受到其他一些来源于外胚层的分子的调控。在体外实验中，将浸润有来源于外胚层的信号分子——FGF4 的丙烯酸小球，用与多配体聚糖具有亲和力的类肝素标记，植入间充质层中或与分离的间充质共同培养，可以促进间充质细胞的增殖和多配体聚糖的表达。其他一些成纤维生长因子如 FGF3 等也有类似的作用。这一现象说明，在多配体聚糖基因的上游可能有一些受到 FGF 等调控的增强子的存在，从而使多配体聚糖的表达受其正向调控。同样的关系可能还存在于多配体聚糖和 Msx1 基因之间。在 Msx1 基因缺失的小鼠中发现多配体聚糖的表达水平明显下调，说明 Msx1 可能也是对多配体聚糖的表达有正向调控作用的分子信号。但 Msx1 究竟作用在多配体聚糖表达的哪个环节，是直接作用于多配体聚糖或是在其上游若干级起着间接调控作用，目前还不得而知。

3.细胞外基质对信号分子的调节 另一个值得注意的问题是，这些位于多配体聚糖上游的上皮源性调节分子，并不是直接弥散进入间充质中与其发生作用，而是必须首先与位于上皮细胞和间充质细胞周围的细胞外基质接触，并发生一系列的相互作用。因此，在这一水平，可能是又一调节多配体聚糖等表达和间充质分化的环节。例如，上皮细胞中转化生长因子 β 是以前体形式分泌，必须在细胞外基质中被特定蛋白水解酶分解后才能被活化。在研究中观察到，在牙胚间充质中存在大量未能水解活化的转化生长因子前体，说明并不是所有由上皮细胞

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

分泌的转化生长因子都能转化为活性形式。这提示细胞外基质对这些信号分子的呈递和活化可能是一个限速环节，以此精细地调节其对间充质诱导的时机和强度。

相似的调控机制同样存在于 BMP4 的调节中，这主要是一些位于细胞外基质中的 BMP 结合蛋白在起作用。前文中提到，果蝇的 dpp 与人类的 BMP 高度同源，并发挥与 BMP 类似的诱导牙胚分化的作用。现在发现在果蝇中存在与 dpp 相拮抗的 sog 基因，能抑制 dpp 诱导分化的作用。目前，用 sog 作为探针杂交，已经在脊椎动物中发现了与 sog 基因高度同源的序列，并已克隆命名为 Xenopus 基因，其表达产物在体外能抑制 BMP 的活性，被认为可能在体内具有调节 BMP4 活性的作用。另外，在鼠源性Ⅻ型胶原基因编码其前体多肽 N 端的序列中，可以选择性地出现一个 Cys - 10(CR)位点，该位点序列与果蝇的 sog 亦高度同源，其转录产物亦具有抑制 BMP 家族活性的作用。在人体内最新发现的一种称为虾红素蛋白水解酶家族的物质，在酵母双杂合筛选实验中，也已证实有调节 BMP4 活性的作用。虽然以上这些可能与 BMP 相关的调控基因，在牙胚发育中的作用机制尚未明确，但至少说明了 BMP 等决不仅仅是简单地弥散进入间充质，诱导其分化，而是有着其复杂的调控机制。

同样，细胞外基质也调节着前面提到过的另一重要信号分子——成纤维生长因子的活性。众所周知，成纤维生长因子具有与类肝素样分子结合的能力，因此，包括我们在前面着重讨论过的多配体聚糖等具有硫酸肝素样结构的蛋白多糖，就具有与其结合并调节其活性的作用。分析认为，多配体聚糖可能作为一种低亲和力的成纤维生长因子配体，在其调控过程中起到信号呈递的作用。除成纤维生长因子外，另外一些细胞表面分子，如 MK、HB - GAM 角蛋白分子，也属于具有肝素结合位点的蛋白分子，在由上皮细胞向间充质弥散的过程中，也在细胞外基质中受到类似调控机制的影响。

（二）间充质细胞增殖的调控

在体外进行的牙胚上皮和间充质细胞的重组实验中，已经证实上皮细胞的存在是诱导间充质细胞增殖的先决条件，同时又通过一系列反馈信号，对间充质细胞增殖的速率进行着调控。调控因子可能包括前面提到的多配体聚糖及其配体腱生蛋白，以及一种与细胞增殖密切相关的原癌基因 myc 的蛋白产物。通过免疫组织化学染色发现，在间充质细胞中有 N - myc 的表达，而在牙胚上皮中为 C - myc 的表达。通过检测 N - myc 和 C - myc 的表达强度，可以在一定程度反应细胞的增殖情况。另外，用 BrdU 标记技术检测分裂增殖细胞（主要是处于有丝分裂 S 期的细胞），同时检测多配体聚糖及其配体腱生蛋白的表达，发现增殖指数与多配体聚糖的表达强度密切相关，与其配体腱生蛋白也有较弱的一致性。说明多配体聚糖除了诱导间充质细胞聚集外，对调控其增殖也有一定作用。成纤维生长因子在牙胚发育的全过程均有表达，已证实对间充质细胞的聚集和增殖都有一定的调控作用，在体外培养中，加入成纤维生长因子 4 可以促进牙胚间充质细胞的增殖。总之，以上的各种生长因子、细胞外基质可能通过相似的机制共同对间充质的增殖起着调控作用。

在来源于外胚层的信号分子中，尽管 BMP4 本身不具有促进细胞增殖和多配体聚糖表达的作用，但是，从理论上讲，与 BMP4 同属转化生长因子超家族的转化生长因子 β，能够通过与成纤维生长因子，或其他在牙胚中表达的具有肝素结合位点的生长因子结合，从而间接地促进细胞的增殖。实验中，亦已检测到在间充质的聚集和增殖过程中，有转化生长因子 β1 的表达，并且与多配体聚糖和腱生蛋白的表达量有一定的相关关系，可能对后者的表达水平有一定的调节作用。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

三、牙齿发育后期的基因调控

(一)造牙本质细胞的特化

造牙本质细胞的发育,包括成牙潜能的获得、有丝分裂后的细胞极化并沿牙髓呈单层排列、终末分化、牙本质基质的分泌,以及矿化等一系列的过程。造牙本质细胞的分化主要出现在胚胎发育的17天至18天,这时牙胚中再次出现了曾在牙发育早期出现过的Msx基因及其他一些转录因子的表达。一些与牙齿早期发育过程中相类似的调节通路同样出现在牙齿的后期发育过程中。

牙本质的形成最初起源于来自神经嵴的一部分获得了造牙潜能的细胞群,并最终分化成为包括造牙骨质细胞、造牙本质细胞、牙周细胞和牙髓细胞在内的多种成熟体细胞的前体细胞。在牙齿发育的早期,来源于间充质的牙胚乳头细胞具有分化为造牙本质细胞或牙髓细胞的双向分化潜能,其最终的分化方向受到上皮——间充质界面的一些分子的影响。造牙本质前体细胞主要位于与内釉上皮相邻的内侧面,二者在相互接触中通过一系列的相互作用,调控着细胞的分化方向和分化后细胞的定位。在造牙本质细胞的终末分化中,伴随着一些特异的细胞水平的规律性变化,如造牙本质前体细胞分裂停止,纺锤体转为与基底膜呈垂直向,细胞向基底膜移动并接触,细胞伸长并极化。造牙本质细胞的这种极化过程与细胞内骨架的改建有关,包括细胞微丝、中间丝和细胞微管的重排。进入造牙本质细胞终末分化的末期,出现Ⅰ型、Ⅲ型、Ⅳ型和Ⅴ型胶原以及一些非胶原蛋白的分泌,这些非胶原蛋白包括了骨唾液酸性蛋白(BSP)、牙本质唾液酸性蛋白、骨钙素和骨连接蛋白等。其中,还包括两种重要的牙本质磷酸蛋白——牙本质磷蛋白和牙本质基质蛋白。有证据表明,在一定程度上,这些分子事件的发生是前面已多次强调的上皮—间充质相互作用的结果。例如,多项体内和体外研究已经证实,通过胰酶消化去除牙乳头附着的上皮后,在没有来源于上皮的分子信号的情况下,根本无法分化形成造牙本质细胞。但最近的一项实验中,在单层培养的牙髓细胞中,即使没有上皮的影响,也能形成一些造牙本质样细胞。目前可能的解释是,分化终末的牙髓细胞已经获得了某些分化必须的信号,并通过自身的放大作用维持其余下的分化过程。

1.内釉上皮对造牙本质细胞终末分化的调控 内釉上皮对造牙本质细胞终末分化起着重要的调控作用,关于其调控的机制,目前也有较多报道。早在30年代,就有人通过在体外培养牙乳头和成釉器发现,上皮和间充质的相互协调作用是造牙本质细胞功能性分化的前提。在实验中,牙胚上皮在间充质的作用下能分化成为内釉上皮,而牙乳头在内釉上皮的诱导下分化出造牙本质细胞,再次证明了这个过程中二者的相互诱导和调控。另外,如果先用BrdU标记处于有丝分裂S期的釉细胞,并将处于增殖分裂相的成釉器在体外与牙乳头共同培养,发现造牙本质细胞的分化过程受到了抑制,提示内釉上皮本身的增殖能在一定程度上负向调节造牙本质细胞的分化过程。正如在前文对细胞外基质的讨论中提到,基底膜对造牙本质细胞分化的影响、内釉上皮的完整的基底膜在调节造牙本质细胞的分化中发挥了相当作用。在实验中如果将基底膜降解破坏,再与牙乳头共同培养,不能立即诱导其分化;而在培养15~18小时后,随着完整基底膜的重新合成,牙乳头的分化才能正常进行。基底膜的作用还可以从另一个反面的证据中得到印证,衣霉素能有效地抑制造牙本质细胞的分化过程,可能正是因为衣霉素能严重地破坏基底膜的完整性。

别的一些可能来源于内釉上皮的细胞外基质成分,如Ⅲ型胶原、纤连蛋白、核心蛋白聚糖

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

(decorin)和腱生蛋白,也在造牙本质细胞的分化过程中发挥了一定作用。在牙胚发育的早期,进入造牙本质细胞分化阶段以前,Ⅲ型胶原主要聚集于基底膜中,但在造牙本质细胞分化开始后,就出现表达量的明显下调;而纤连蛋白则表现出相反的趋势,在造牙本质前体细胞和极化细胞中高浓度表达;核心蛋白聚糖出现与纤连蛋白一致的改变规律;而表达于基底膜的腱生蛋白和釉蛋白的表达强度也大为增加。这些与造牙本质细胞分化过程协调的变化,提示这些分子在这一分化过程中起着一定的作用。

除了内釉上皮的细胞外基质的作用外,一些生长因子和转录活化因子也在造牙本质细胞的终末分化过程中发挥着类似的作用。例如,转化生长因子 β1 在牙发育过程的钟状期早期表达削弱,但在分化的分泌期造牙本质细胞中高强度表达。又如,成纤维生长因子 3 在间充质聚集、造牙本质细胞分化开始指导分化发育成熟的过程中均有表达。这两种生长因子的表达,据推测与上皮—间充质间的信号传导通路有关,通过它们调节着造牙本质细胞发育中的其他基因的表达。

在与牙乳头相邻的间充质中,还出现了转化生长因子家族的另一成员——转化生长因子 β2 的表达。这样,目前已经观察到了转化生长因子 β1~3、神经生长因子等多种生长因子及其相应受体,在造牙本质细胞分化过程中出现并参与其调控。

2.*Msx2 和 BMP2 在牙齿发育后期的作用* 除了上述细胞因子外,在牙齿发育早期的调控中发挥了重要作用的 Msx 基因,在牙齿发育后期同样起着重要的作用。据检测,在造牙本质细胞分化初期,Msx2 的表达明显增加,并且伴随着转化生长因子家族成员 BMP2 的相应改变。这种改变的伴随关系,与在牙发育早期出现过的 Msx1 与 BMP4 的关系有一些相似之处。具体地讲,在帽状期,Msx2 的表达主要局限于邻近内釉上皮的牙乳头细胞中,在牙齿发育后期,造牙本质细胞和造釉细胞的分化开始后,这些细胞中的 Msx2 表达转为阴性;而原本不表达 Msx2 的未分化牙乳头细胞,在分化为造牙本质细胞和造牙本质下层后,则出现 Msx2 的强阳性反应。相类似,在帽状期 BMP2 表达于牙乳头中央部位的间充质细胞中,而后期则表达于与 Msx2 相同的细胞层次中。在 Msx2 基因缺陷型小鼠中也观察到了造牙本质细胞分化的停滞。这些结果说明,BMP2 和 Msx2 在牙齿发育晚期的表达改变,是造牙本质细胞分化过程中的重要一环。据推测,其作用原理是:已知造牙本质细胞的分化过程在一定程度上受到内釉上皮增殖的影响,而 Msx2 的一个作用是促进细胞增殖并抑制细胞凋亡,从而可能通过这一通路间接地维持了造牙本质细胞的分化进程。

(二)造釉细胞的特化

与造牙本质细胞的特化过程相比,造釉细胞的特化时期早于前者。牙釉质形成过程可以看作是从造釉细胞的前体——牙板的形成开始的一个自然延续的过程,最后以分化为具有牙釉质分泌能力的造釉细胞而结束。在这一过程中,有几种牙釉质发育中特有的基因先后表达。第一种称为簇蛋白基因,编码一种阴离子釉蛋白,该蛋白最早在胚胎发育的 13 天就开始表达。在这一阶段,内釉上皮还未极化,仍然处于分裂增殖的阶段。到帽状期,除了簇蛋白外,内釉上皮还开始表达釉蛋白。后来发现,在帽状期釉蛋白开始表达前、簇蛋白表达之后,还有第 3 种,即造釉蛋白的表达。这些结果说明在胚胎发育的 14 天以前,造釉作用已经开始,所以可以理解为什么在帽状期或钟状期后,将造釉器离体与其他组织重组后,仍然能继续牙齿发育的全过程。此外,在帽状期后将上皮分离后培养,可以正常地表达釉蛋白。提示来源于间充质的簇蛋白和釉蛋白表达的促进因子,可能在更早期就作用于牙胚上皮,这与前文中关于上皮与间充质

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

的相互作用是一致的。

在造釉细胞分化过程中，除了牙乳头中间充质细胞的影响外，牙胚星网层和中间层通过一些重要分子也起到了一定的作用。例如，在钟状期后期，星网层和中间层中均有 Msx2 的表达；而动物实验也证实，在星网层和中间层中 Msx2 表达阴性的情况下，往往出现牙釉质发育的缺陷。

四、小　结

以上主要讨论了在牙胚发育的不同时期，参与牙胚发育调控的多种外胚层信号分子、转录活化因子、细胞外基质分子等在这一漫长过程中的作用及动态变化规律，始终贯穿整个牙胚发育过程的上皮—间充质的相互诱导、相互调节信号也正是依赖于这些细胞因子的传递。图 3－11中大致显示了这些细胞因子的作用阶段，但要完全明了在这一过程中细胞因子的彼此作用，目前还有相当的难度。

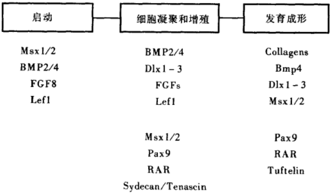


图 3－11　牙胚发育不同阶段信号分子作用模式图

第三节　唇腭裂的分子生物学机制

唇腭裂（cleft lip and palate，CLP）是一种常见的先天畸形，尽管其病因尚未明确，但一些基因异常被认为是一部分家族性唇腭裂的重要原因。通过大量分子生物学研究，目前发现位于染色体 6p 的转化生长因子－α、位于 17q 维 A 酸受体－α、位于 4p 的 Msx1 等均与部分家族性唇腭裂有关。近年来，确定与家族性唇腭裂相关的特定基因位点一直是这一研究领域的热点。

一、转化生长因子－α

在寻找与 CLP 相关的可能基因的过程中，研究者发现，从一些与头面部发育关系密切的所谓候选基因中筛选，具有较高的成功率。而转化生长因子－α（transforming growth factor alpha，TGF－α）正是目前一个最有可能的候选基因。

一些研究者将 CLP 患者 TGF－α 等位基因的出现频率与正常对照组进行了比较，结果发

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

现在 CLP 患者的 Taq1 位点等位基因的出现频率增高，显示 TGF－α 与 CLP 之间存在密切关系。虽然腭形成的早期和晚期在基因调控和胚胎学上均有差异，而通常认为 TGF－α 主要在晚期起较重要的作用，但其是否同样与早期腭形成有关尚难以肯定。

二、4p16 区位的 Msx1 基因

动物研究发现，在特定的 Msx1 基因所在区位缺失的小鼠中出现腭裂的损害。由于 Msx1 基因并不在胚胎的腭部发育的过程中表达，因而这一发现令人意外。目前的解释有两种：①Msx1 基因可能通过与其他基因之间的相互作用影响腭部的发育；②由于正常情况下 Msx1 基因多在下颌发育过程中表达，如果腭裂是下颌异常发育的结果，那么 Msx1 基因的确可能引起腭裂的发生。但这些推测目前还仅限于动物实验研究，在大规模的人群调查中还未得到证实。最近的一项研究检验了腭裂与 Msx1 基因缺失的相关性，却未能得到阳性结论。同时，该项研究还对其他一些分子标志与腭裂的相关性进行了分析，发现除 Msx1 基因外，位于 19q13 区位的原癌基因 bcl－3 与某些家族性腭裂有更密切的相关性。

三、17q21 区位的维 A 酸受体－α 基因

同样，维 A 酸受体－α(retinoic acid receptor alpha，RAR－α)基因与腭裂发生的关系亦存在较大的争论。支持该基因的异常与家族性腭裂发生有关的证据，主要来源于动物实验研究。在一最近发表的动物研究中，研究者发现腭裂小鼠中一段基因区位高频改变，该区位与位于人类 17 染色体的维 A 酸受体－α 基因高度同源，间接提示了维 A 酸受体－α 基因与腭裂的相关性。但在人群研究中，上述结论亦未得到充分证实，甚至有学者根据一些研究认为，不应将维 A 酸受体－α 基因列为家族性腭裂的候选基因。

四、唇腭裂中基因与环境因素的相互作用

尽管目前的研究还未能明确影响唇腭裂的基因的准确定位，但关于与唇腭裂相关基因与环境的相互作用的报道较多。有研究者曾研究患者居住地的改变与唇腭裂的复发的关系，但尚未得到阳性结果。而此前关于一些药物与唇腭裂的关系的研究较多，如苯妥英、维 A 酸等均被认为与唇腭裂有较密切的关系。吸烟和饮酒也可能与唇腭裂有一定相关性。已有研究认为，这些环境因素可能通过增强特定个体固有的基因缺陷而在唇腭裂的发病中起到重要作用。

五、小　结

综上所述，目前认为位于染色体 6p 的转化生长因子－α、位于 17q 的维 A 酸受体－α、位于 4p 的 Msx1 等均与部分家族性唇腭裂有关。但这些基因在唇腭裂发病中的具体作用机制，及这些基因之间、基因与环境因素间的相互作用均未明确。随着这些问题的回答，对唇腭裂发病的分子机制的理解将进一步深入。

（罗　刚　唐高妍　陈谦明）

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

参 考 文 献

1 Maas R. The Genetic Control of Early Tooth Development. Crit Rev Oral Biol Med, 1997,8(1): 4

2 Brookes SJ, Robinson C, Kirkham J, *et al*. Biochemistry and molecular biology of amelogenin proteins of developing dental enamel. Archs Oral Biol, 1995,40(1):1

3 Hibbert SA & Field JK. Molecular basis of familial cleft lip and palate. Oral Diseases, 1996,2: 238

4 吕红兵,金 岩.牙胚和面突发育中骨形成蛋白及有关因子的基因调控.国外医学口腔医学分册. 1998,25(2):102

5 Ferguson DB. Aspects of oral molecular biology, Front Oral Physiology, 1 ed, Basel: Karger,1991

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第四章　常见口腔微生物的分子生物学

第一节　龋病微生物的分子遗传与分子生物学

一、致龋性链球菌突变株的分离

病原微生物突变株的分离在微生物学研究中具有重要的地位。因为特异突变株的成功分离,不仅能提供细胞水平研究病原体毒力机制的可能,同时也提供了构建全菌疫苗的可能性。这些突变株能够诱发机体的免疫反应,但同时几乎不引发或只引发轻微的病理效应。此外,突变株也为研究者提供了一条研究细胞毒性的生物化学途径,因为一种遗传确定子(determinants)功能的消除,可能会加速另一种遗传确定子的纯化。因此,只要能特异地、选择地使编码病原体毒性产物的遗传确定子失活,即能分离出病原体的特异性突变株。此外,特异突变株的分离还需有另一前提:即要能复制出适当的动物模型。因为,只有在复制的动物模型上,研究者才能通过比较研究,确定突变株在定植及毒力等方面与野生株的区别。牙体龋坏的动物模型已在几种动物身上成功建立,因此,致龋性链球菌突变株的分离与测试具有可行性。

致龋性链球菌突变株的分离,在认识及印证病原体的重要表型特点方面具有重要意义。然而,研究者在此实验途径中要注意,化学性致突变剂可能导致多种突变的发生,特别是N-甲基-N-硝基-N-亚硝基胍(N-methyl-N-nitro-N-nitrosoguanidine)致突变剂,磺基乙基甲烷(ethyl methane sulfonate)也具有类似的特性。采用这些化学诱变剂可能出现一个问题,即单个表型可能是两个不同的遗传基因改变的结果。但可以采用一些措施印证获得的突变,使这一潜在的并发症减轻到最低程度。一种方法是将获得的突变株基因引导至未突变的、同种菌系的母代,或选择出原始突变株的回复突变株。前者在目前对致龋性细菌的分离常常是不可能的,因为在所有致龋菌中都具有可操作性的基因转移系统(见下)相对缺乏;然而,回复突变株的分离,已经有效地应用于证实不溶性葡聚糖合成与致龋性的关系。另一种方法可能会有帮助,但还不足以得到结论,即测试突变分离株在致病特性上与野生型相比具有的特点。此外,根据不同种系的链球菌在动物模型上致龋具有不同的特点,甚至,同一Brattha Ⅱ血清型的链球菌其毒力也具有明显差异的理论,利用定菌(即无特异的致病细菌)动物的研究可以获得突变株产生的不同的毒力数据。生物化学与分子生物学克隆途径已经证实,多数认为对于细菌毒力重要的基因产物(如细胞外酶、表面蛋白抗原)的分子相对较大,而大的基因产物不会同时具有多种功能。因此,假如怀疑获得的突变株同时具有两种突变,可以通过重组DNA的方法使其某一基因产生错义突变,从而改变基因产物的特性,同时观察第二表型特点有无改变,即可证实突变株的突变特点。

勿庸置疑,传统的遗传学方法在突变株的分离与研究方面起到了很大作用。然而,通过分子克隆技术所产生的特异性突变株,使研究者可以得到更加具有对比性、精确的遗传工具。比如等位交换技术(allelic exchange)已被证实在变形链球菌的研究方面具有重要作用。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

将从经典遗传致突变途径获得的突变株与克隆到的链球菌基因偶联进行研究具有很高的价值。例如,从经典途径可能获得许多不能合成细胞外葡聚糖的突变株(这些突变株已经在动物模型上得以证实),研究者即可利用从葡糖基转移酶基因得到的亚顺反子(subcistronic)DNA探针,评估这些菌株存在的分子损害。其结果可以帮助利用寡核苷酸引物去克隆和序列分析这些基因,从而确定存在于核苷酸水平的各种突变。然后,可以将上述结果与以降解高分子量的葡糖基转移酶分子链的生物化学研究结果相比较。假如需要,同源菌系还可以采用此新资料加以构建,并且在体外再测试。简言之,最近几年口腔链球菌的分子克隆研究进展很快,利用这些进展进一步研究以往分离到的致龋性链球菌的突变株,显然具有重要意义并充满希望。表4-1总结了致龋性突变株的简要信息。

表4-1 致龋性链球菌的突变表型

原始表型	粘附于牙面能力	自身聚集	动物牙面致龋力
水不溶性葡聚糖缺乏	+或 -	+或 -	降低
水溶性葡聚糖缺乏	+	+	无变化
水不溶性葡聚糖高产株	+	+	增加
细胞间多糖储存缺陷株	未确定	未确定	降低
乳酸脱氢酶缺乏(低酸株)	未确定	未确定	降低

二、口腔链球菌分子遗传学特性

(一)质粒与结合

质粒是存在于微生物染色体以外的一段具有自主复制能力的环状DNA。与其他的原核生物一样,寻求染色体外遗传成分的研究推动了分子生物学技术应用于致龋性链球菌的研究。因为质粒不仅能提供微生物生物学上的一些特性,如交合子提供能力;而且还能够提供完成致龋性链球菌分子克隆所需的粗原料。许多研究显示,5% - 10% Bratha Ⅱ 变形链球菌的c和e血清型中存在小质粒(10 kb)。小质粒也能在野生鼠链球菌(*S. ferus*)中发现,但其频率更低。到目前为止,企图将致龋性链球菌的某些表型功能与天然的质粒相关联的研究尚未成功。然而,有些质粒已经被用于构建克隆载体,并加速了各种链球菌菌系的分子遗传学分析研究(表4-2)。

尽管天然的交合性质粒在致龋性链球菌中尚没有发现,但能够通过交合将广谱宿主质粒PAM -β1(交合性,具红霉素抗药性)从粪肠球菌(enterococcus faecalis, *E. faecalis*)转移到远缘链球菌(*S. Sobrinus*)中。Smith 和 Clewell 证实了在肠球菌(*enterococci*)中可应用交合性转移体系 pVA797(pIP501 质粒的衍生体)。他们成功地将含有一段重组质粒的克隆基因,从血链球菌(*S. sanguis*)转移到了粪肠球菌。尽管有这些研究报道,但在致龋性链球菌中至今尚未成功地有效应用交合性转移。但已有报告证实,将交合性转位子(transposon)Tn916 转导到了变形链球菌(*S. mutans*)。在血链球菌发现了与 Tn916 相似的交合性转移子,有证据显示它们是天然存在于致龋性链球菌之中。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

表 4-2 链球菌质粒克隆载体及其先代

质粒载体	大小(kb)	遗传标记	宿主或复制子
母代质粒			
PAMβ1	25.5	Em^r	粪链球菌(*S. faecalis*)
PIP501	30.0	Cm^r, Em^r	粪链球菌(*S. faecalis*)
PVA380-1	4.2	Cryptic	野生型链球菌
PVA318	5.4	Cryptic	变形链球菌
PACYC184	4.0	Cm^r, Tc^r	大肠杆菌
通用克隆			
PGB301	9.8	Cm^r, Em^r	PIP501
PVA736	7.6	Em^r	PVA380-1
PVA749	5.2	Em^r	PVA380-1
插入复制突变载体			
PVA891	5.4	Em^r, Cm^r(大肠杆菌) Em^r(链球菌)	大肠杆菌
穿梭质粒载体			
PVA838	9.2	Em^r, Cm^r	PVA380-1 PACYC184
PSA3	10.3	Cm^r, Tc^r, Em^r	PIP501, PACYC184
PYA629	11.2	Em^r, Tc^r	PVA318, PACYC184

注:kb:千碱基对;

抗生素抗药性标记:Em—红霉素,Cm—氯霉素,Tc—四环素

(二)转化

细菌细胞从环境中摄取并稳定 DNA 遗传的过程被称之为转化(transformation)。口腔中许多血链球菌系都具有所谓的遗传能力及以高效率转化质粒或染色体 DNA 的能力。血链球菌的转化系统可用于构建各种重组质粒,这些质粒能够被当作口腔链球菌基因的克隆载体。这一系统的研究被一种理论所促进。有学者认为将链球菌基因克隆到大肠杆菌可能不会完全得以表达;而且,获得的各种链球菌克隆具有下述优点:①在同源背景上研究链球菌基因表达;②允许构建部分二倍体菌系;③允许引导突变基因进入宿主染色体;④使研究者能够大量获得特异性基因产物。这些研究目的现在已经基本实现。

由于血链球菌转化系统被用于构建具有应用前景的质粒克隆载体,从而更新了在此微生物中的分子克隆策略。与此系统有关而需要解决的是:在转化后伴随着双链 DNA 的摄取,DNA 的处理问题。因为这些 DNA 在进入细胞的过程中,被转化成了单链 DNA,质粒是从这些单链 DNA 中再聚集而形成。在血链球菌的质粒 DNA 的转化过程中,发现有一个第二顺序动力学(second-order kinetics)的过程。这种情况在链球菌基因克隆中会产生严重问题,因为第二顺序动力学有效地阻碍了细胞内完整的重组分子的形成。为了预防这一问题,在血链球菌中发展出了一种基因拯救(gene rescue)系统。此系统能使研究者随 DNA 进入细胞后立即捕获得到重组分子。这一系统已成功地将变形链球菌染色体基因克隆到了血链球菌之中。

在 1981 年,Perry 与 Kuramitsu 发现一些变形链球菌的菌株可能具有遗传能力,能利用染色

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

体与质粒 DNA 进行转化。这一发现使研究者能够直接将特异性的 DNA 片段引入变形链球菌的细胞。这也是通过等位交换方法获得突变株理论的基石。研究发现，变形链球菌的遗传能力具有与血链球菌相似之处。与血链球菌相同，变形链球菌的遗传能力具有可诱导性(inducible)。质粒与染色体 DNA 都非特异性地粘附于遗传细胞的表面，粘附的 DNA 约 50% 被降解，伴随着单链的进入，而不是双链进入细胞。与血链球菌一样，单体性质的质粒 DNA 采用第二顺序动力学转化变形链球菌。这种外源性 DNA 由双链变成单链进入细胞，紧接着两条质粒分子部分再聚集而形成双链 DNA 分子的过程即为第二顺序动力学。这些事件使该细菌的分子克隆与血链球菌一样变得复杂化了，即要求使用辅助性质粒系统(质粒自救系统)进行克隆研究。变形链球菌与血链球菌的遗传能力存在差距，主要在于实际转化后获得具有遗传能力的细胞的比率不同。几乎所有的血链球菌细胞都能够被诱导而具有遗传能力，而不到 1% 的变形链球菌细胞能够形成这种能力。这种现象的基础尚不清楚，但很明显，这种现象是变形链球菌具有较低转化频率的原因。而且，这一过程可能在体内的口腔链球菌的遗传信息交换方面发挥了作用。

(三)重组 DNA

口腔微生物的基因克隆涉及到多种克隆载体与系统。直接将各种口腔微生物的基因克隆到大肠杆菌使用的载体包括质粒、COS 体、噬菌体。总的来讲，链球菌基因序列较容易在大肠杆菌体内转录与翻译。

血链球菌拥有天然转化能力，使其成为口腔链球菌基因克隆的首先考虑菌系；变形链球菌的转化能力虽然较低，但也能用于构建载体，许多研究小组已经构建了用于口腔链球菌的基因克隆载体。表 4-2 提供了这些载体的简要描述。这些克隆工具中，最常使用的一类载体是穿梭载体及直接突变载体。前者的分子在本质上具有双功能序列，它能在大肠杆菌和链球菌中复制。此外，它们还含有分别在两种不同宿主中表达的选择性标记(抗生素抗药性基因)。这些载体常被应用于克隆在大肠杆菌中易于被研究的基因序列的克隆。即这些被研究的基因序列能在大肠杆菌中采用免疫的、功能的或 DNA 同源序列的方法测定到。该重组质粒然后被纯化，并通过转化进入希望的链球菌宿主之中。重组细胞借助辅助性的质粒克隆方法，能以较好的效率选择或通过采用高浓度 DNA，使第二顺序动力学发挥作用，以使变形链球菌或血链球菌的质粒发生转化。

直接突变载体是采用可能得到的克隆基因序列，构建特异性的突变株。该质粒包含有大肠杆菌起源的复制位点，及在链球菌宿主细胞中表达的抗生素基因。其主要过程如下：首先，克隆可疑的反式基因片段到大肠杆菌载体中。这些片段必须是内在性的，必须不含任何一个顺子的末端，以避免在重组过程中产生部分性复制。然后，分离重组质粒，并用于转化链球菌的细胞，并选择适当的抗生素表型。因为质粒在链球菌细胞中不复制，唯一的获得抗生素抗性子的途径是通过将质粒整合进入基因组。此过程可由克隆的 DNA 序列介导的质粒与染色体之间的相互重组而完成。重组将待研究的基因拼接，并导致插入突变。整合位点的序列在重组过程中得以加倍，因此，常将此过程称为插入双倍突变(insertion - duplication mutagenesis)。

采用克隆基因获得特异突变的另一途径是等位交换技术。这种技术在某些方面具有与插入双倍突变相似之处。其过程如下：从链球菌中获得待研究染色体的片段，并在体外插入一段能在链球菌中表达的抗生素抗药性标记基因，插入位点一定在基因的编码序列之内。当重组质粒转移进入大肠杆菌并进行选择后，通过转化的方式被引导进入链球菌细胞，并再次通过抗

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

药性基因进行选择。因为在重组质粒中，染色体 DNA(包括待研究的基因)位于抗生素抗药性盒子的两翼，并与链球菌的基因组具有同源性，因此，重组基因得以通过额外的整合插入到染色体，从而获得了缺失一个拷贝基因的突变型基因。然后，再采用生物化学或动物实验评价这些突变子。等位交换是一条制造特异性突变子强有力的途径，它大大地降低了应用化学性致突变剂，以及产生多发性突变可能的危险。然而，需注意的是，等位交换时，插入突变可以引起下游基因序列的极性效应，从而引起这些突变株遗传信息的错译。这个问题可以通过在下游序列再次插入一额外的插入突变，并对比评价这些突变的效果得以解决。

另一不用化学或物理因素诱发突变而获得突变株的技术，是将可转位片段(transposable elements)插入宿主染色体，诱发特异性插入突变。许多转位子能在转移过程中随机插入靶 DNA，因此，它们能够实现此目标。应用于此方法的可转移的遗传性成分含有抗生素抗药性标记，从而能够直接选择测定转移性突变子。为了应用此方法，研究者必须寻求一种方法将转位子传递到细胞，并且在此过程中，迫使转位子转移进入靶 DNA。这些通常是微生物转位子诱发突变方案发展过程中的限速(rate – limiting)因素。Kuramitsu 获得了一个可以在口腔链球菌中表达的转位子，由肠噬菌体 mu 携带红霉素抗药性基因构成。该研究者将此转位子用于大肠杆菌，以诱发携带有葡糖基转移酶基因质粒的突变。然后将携带已失活的转移插入片段重新转导回变形链球菌中，从而产生一突变株细菌。此株细菌不能产生水不溶性细胞外多糖。另外，Procino 等报道，Tn916(具有四环素抗药性)能够作为质粒的一部分被转导进入变形链球菌，但并不能在此宿主中复制。通过四环素抗药性的选择后，获得了在染色体各位点上携带 Tn916 的转移性突变子。部分该转移性突变子为营养缺陷型，需要在特定的培养基(含特殊的氨基酸)上生长。这种技术的优点还在于能通过直接选择的方式即能克隆到转位子两侧的区域，并利用转位子在染色体的各个位点上作标记，以增强连锁分析及遗传图谱。

随着分子生物学的发展，新的研究手段和工具不断出现，口腔微生物学家从而能进一步利用这些工具克隆口腔细菌基因，弄清基因特性，或创造出具有特异性的新突变子。例如，Caufield 与同事将隐匿性质粒作为遗传标记，进行口腔链球菌的流行病学与家庭传播性研究。此外，他们还利用限制性内切酶技术，消化链球菌染色体 DNA，并用这些消化片段从事相同目的的研究。这类分子水平的分析研究，也被用于调查口腔链球菌菌系与细菌性心内膜炎发作间隙关系的研究。遗传指纹研究方法虽然从技术上说较血清或毒素分型更难，但具有更高的应用价值及可靠性。

(四)基因图谱

由于血链球菌能被转化，因此，可以通过连锁分析确定基因的位置。分子克隆技术加强了确定克隆基因片段相对位置的能力。在单倍体原核生物，基因连锁是通过转导全细胞 DNA 进入细胞，并评价两种遗传标记的共转化频率确定的。克隆 DNA 片段的直接分析以及共转化研究是应用于研究变形链球菌基因染色体定位的方法。在诱导遗传能力后，克隆的 DNA 片段被转导进入变形链球菌。混合培养研究显示，口腔链球菌能够利用此系统在人体口腔内交换 DNA。这种菌系间异源性特异遗传信息的交换，具有加强潜在的病源因素在口腔菌群中进化的作用。

迄今为止，变形链球菌染色体图谱的研究主要集中于确定各种克隆位点相互间及距标准染色体标记的联系程度。对于具有不能直接选择的基因，如象 gtf A(具有蔗糖磷酸化酶活性的一种酶)，需要在待研究的基因附近或基因中，利用重组 DNA 技术插入选择性的抗生素抗药

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

性标记。通过这些技术，Perry 和 Kuramitsu 发现 gtf A 基因与甲硫氨酸(methionine，Met +)基因密切相关，但与细菌素产物或其他营养缺陷标记如色氨酸(tryptophan)或异亮氨酸(isoleucine)不相关。进一步的研究显示，gtf A 基因与果聚糖基转移酶(fructosyltransferase，ftf)和 6－磷酸蔗糖脱氢酶(sucrose－6－phosphate hydrolase，scr B)基因亦紧密相关。共转化频率的比较显示，这些基因在染色体上的位置顺序依次是 gtf A，ftf，scr B，而且，gtf A 和 ftf 较近。相似的工作显示，葡糖基转移酶 B 基因(gtf B)与这些蔗糖利用基因相关。其他的直接选择表型，包括氟抵抗力与染色体抗生素抗药性基因(如链霉素或利福平抗药性)都使这些细菌基因组得到了能较好的分析，但还没有通过这些技术完全完成基因的定位。

第二种确定基因连锁更直接的方法涉及到亚克隆 DNA 片段的分析。这项技术要求受分析的 DNA 片段须在 10 kb 大小左右。Kuramitsu 和 Macrina 共同研究的结果是 gtf B 和 gtf C 基因在染色体上的位置相邻。序列分析显示上述两个基因是同一个方向，而且可能由单一的多顺反式信息(polycistronic message)转录。gtf A 基因亚克隆显示，gtf A 与 dex(葡聚糖酶，dextranase)确定子密切相关。但 Perry 却发现，dex 活性与 ftf 相连锁，而与 gtf A 不相关。推测这种观察结论的差异可能是由于变形链球菌染色体上存在着多个 dex 基因，或者是这些研究所采用的菌系中存在着染色体的重组。

变形链球菌利用蔗糖的一种运输方式是磷酸烯醇丙酮酸依赖的磷酸转移酶系统(phosphoenolpyruvate，PEP－dependant phosphotransfe－rase system，PTS)。已认识到，此系统需要 PEP、细胞浆成分酶 I(EI)，与细胞膜相关的糖特异 EⅡ成分。DNA 序列分析显示，变形链球菌 GS－5 的 $EⅡ^{suc}$(即 scr A)基因与 scr B 基因相邻。

各种糖利用基因亚群的密切关联，使研究者们推测它们在变形链球菌的染色体上的某一区域是按顺序排列的。但需进一步的工作印证。目前尚无可能确定这些基因的相互关系，主要是受变形链球菌基因制图系统的限制。其他的革兰阳性或革兰阴性细菌的转导系统，可以一次交换上百万的染色体碱基对，然而，能够转导进入变形链球菌的 DNA 片段的大小相当有限(可能仅仅在 10～40 kb 之间)。但随着大量的限制性内切酶的发现及商业化供应，以及能够通过直角场凝胶电泳(OFAGE)分离大片段 DNA 分子技术的突破，允许在原核细胞染色体上直接进行基因的物理图谱定位，有望使此问题得到解决。例如，Not I 和 Sfi I 能够识别8 bp序列的限制性内切酶，分别能将 4 000 kb 大肠杆菌的染色体切割成 20 份。因此，可以应用这些或相当的酶切割变形链球菌染色体，然后采用 OFAGE 使这些片段分离，并用克隆到的基因作为探针进行 Southern 杂交分析，从而确定与染色体相连锁的特定片段。

使用各种限制性内切酶作出的物理性基因图谱，能够初步了解到变形链球菌染色体上的基因排列情况。例如，Pucci 和 Macrina 在几种血清型的 *S. mutans* 中采用标准限制性内切酶研究 gtf A 周围染色体的状态。结果显示，尽管此基因在相对密切联系的血清型中是很保守的，但在此决定子两翼的区域中却存在一定差异，甚至密切联系的 *S. mutans* 血清型(如相同的 Brattha Ⅱ 血清型)中，染色体亦可能存在着或小或大的差异。一些细微的差异可以通过转化实验或物理遗传图谱研究证实。

三、口腔链球菌的分子克隆

由于口腔链球菌与疾病的关系明确(即龋病)，在口腔菌系中的比例亦很高，因此，它们成为在基因水平研究最多的口腔微生物。血链球菌是牙齿表面早期定植的细菌，特异性地粘附

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

于获得性唾液膜上。它形成菌斑间质的基质，促进其他的链球菌如变形链球菌集聚于牙齿的表面。各种变形链球菌都能够在动物模型上形成龋损，但实际上，根据它们表型和基因型的不同可以被分为几种亚型（表4-3）。变形链球菌是从人类龋损中最常分离到的亚型，其次是远缘链球菌。

表4-3　变形链球菌的分类

菌　　系	Brattha Ⅱ 血清型	DNA 的 G+C 含量(mol%)
变形链球菌(*S. mutans*)	c,e,f	36~38
远缘链球菌(*S. sobrinus*)	d,g,f	44~46
仓鼠链球菌(*S. cricetus*)	a	42~44
大鼠链球菌(*S. rattus*)	b	41~43
野生鼠链球菌(*S. ferus*)	c	43~45
猕猴链球菌(*S. macacae*)	c	35~36

注：Brattha Ⅱ 血清型主要由变形链球菌表面所具有的独特的碳水化合物抗原所决定

导致牙体龋损发生的过程是复杂的（详见其他专著的相关章节）。为了更清楚地说明相关基因的功能，特简单概括如下：在牙萌出后不久，细菌开始在牙齿的表面定植，这些微生物主要由母亲传递而来。最初定植于牙表面的细菌为血链球菌，它能通过其表面分子与获得性膜通过离子交换而粘附于获得性膜上。血链球菌一旦定植后，其他链球菌即开始集聚于菌斑间质，特别是变形链球菌的聚集数量呈蔗糖依赖性增加。这些细菌能产生几种不同的酶，将蔗糖转化为能被用于代谢和粘附的产物。一组为葡糖基转移酶，当蔗糖裂解后，可将葡萄糖转化为葡聚糖多聚物，进一步促使变形链球菌大量地集聚在牙齿表面。随着微生物对蔗糖及其他碳水化合物的代谢，酸性产物不断产生。由于细菌数量之巨，加上其与牙面紧密接触，使唾液对酸稀释不足，最终导致牙釉质表面脱矿及龋损的形成。

通过对龋损发生过程的了解，可以明白该基因克隆的方向主要是致力于正确判定编码与龋损发生有关的毒性物质的基因。从口腔链球菌中已克隆到的部分基因列于表4-4。例如，许多与血链球菌有关的工作旨在克隆决定此微生物粘附于釉质膜表面、并形成定植能力的基因。一旦这些基因研究清楚以后，就有可能利用重组 DNA 技术防止细菌的定植及菌斑的形成。对变形链球菌的主要工作则集中于克隆涉及使这类微生物在菌斑上聚集物质的基因（如葡糖基转移酶），以便进一步弄清此过程，从而预防其发生。其次，有关变形链球菌的候选基因包括转移蔗糖进入细胞的 scr 基因。现了解到，此基因对于为口腔链球菌提供碳源极为重要。另一组有关变形链球菌的重要基因是编码表面抗原蛋白质的基因，这些抗原基因是制备抗龋疫苗的候选基因。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

表 4-4　口腔链球菌克隆的部分基因

位　点	功　能	血清型
变形链球菌(*S. mutans*)		
asd	天门冬氨酸-半醛脱氢酶	c
fru A	胞外 β-D-果糖苷酶	c
ftf	果聚糖转移酶	c
gal	半乳糖代谢	c
gbp	葡聚糖粘附蛋白	c
glc A,C	糖原合成	-
gtf A	蔗糖磷酸化酶	c,e
gtf B	不溶性葡聚糖合成	c
gtf C	可溶性与不溶性葡聚糖合成	c
gtf D	可溶性葡聚糖合成	c
pac	表面蛋白抗原	c
scr A	酶Ⅱ,蔗糖 PTS	c
scr B	6-磷酸蔗糖水解酶	c
Spa P1	表面蛋白抗原	c
唾液链球菌(*S. salivarius*)		
ftf	果聚糖基转移酶	-
suc	蔗糖酶	
血链球菌(*S. sanguis*)		
adh	粘附蛋白抗原	
don	DNA 酶 I	
ssa A	粘附纤毛	
ssa B	粘附蛋白	
ssp5	受体,唾液聚集素	
远缘链球菌(*S. sobrinus*)		
dex	葡聚糖酶	g
gtf I	水不溶性葡聚糖合成	h
gtf S	水溶性葡聚糖合成	h
pag	表面蛋白抗原	g
spa A	表面蛋白抗原	g

(一)细胞外酶

葡糖基转移酶具有将蔗糖裂解后产生的葡萄糖转化为葡聚糖聚合体,从而增强细菌对牙面粘附的能力,它与变形链球菌的致病性密切相关。已观察到,葡聚糖合成缺乏突变株的致龋性降低(见表 4-1 及相关的讨论)。因此,这些酶成了研究的热点。遗憾的是,这些酶很难通过经典的生物化学方法纯化,以致不能精确地确定酶的数量及其功能。重组 DNA 技术在这些基因的研究方面,获得了较传统的生物化学与遗传学方法所取得的更详尽的成果。

1. gtf A　gtf A 基因是从变形链球菌克隆到的第一个基因。此基因由 Robeson 等在 1983 年克隆成功。他们采用当时的一种新颖生物化学方法,测定到大肠杆菌转位子能够部分水解三糖基蜜三糖。这种现象只能在宿主表达了编码蔗糖酶活性(如葡糖基转移酶)的基因时发生。自此以后,其他几个研究小组相继独立地克隆到了此基因。此基因已经被测序,并显示编码一

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

种分子量为 55.7 kDa 的非分泌性蛋白。与其他葡糖基转移酶(GTFs)相比,其分子量相对较小,细胞内定位显示此酶是独立存在的。原本认为 gtf A 基因的产物是一些低分子量的葡聚糖,并进一步地合成大分子的葡聚糖。但 Russell 等的研究显示,gtf A 基因编码的是蔗糖磷酸化酶,因此认为将此基因归于 GTF 家族可能是一种误会。但是,他们的结果并不能解释当此基因转移进入血链球菌以后,水不溶性葡聚糖合成增加的实验现象,而且,Barletta 和 Curtiss 的研究显示,在其启动子的控制之下,gtf A 基因及其产物与变形链球菌利用底物的能力有关。因此推测,gtf A 及其产物与上述所有的功能都有关。Barletta 构建并评估了 gtf A 缺乏突变株在定菌鼠动物模型上的特点,结果发现,与野生的变形链球菌相比,这些突变株的毒力并没有多大的差别。尽管我们缺乏对此基因产物的精确认识,但该基因的成功克隆在研究 gtf A 编码酶的结构与序列,以及评价变形链球菌的致龋作用中起到了积极作用。

2.葡糖基转移酶基因家族(GTFs) 在变形链球菌中,克隆到 3 种不同的编码 GTF 活性的基因。这些基因产物的分子量都在 150~160 kDa,并以轻微的不同链接方式利用蔗糖裂解产物——葡萄糖合成葡聚糖。gtf B 基因由 Aoki 等在 1986 年克隆到。此基因在重组 λ 噬菌体文库中,使用免疫性抗 GTF 基因产物的抗血清发现。该基因测序后显示编码分子量为166 kDa的产物。并在 N 末端具有革兰阳性信号序列。gtf B 酶合成水不溶性葡聚糖多聚物,通常认为此物质在微生物致病时具有重要的作用。Kuramitsu 通过插入转位子使基因失活的方法,构建了缺乏 gtf B 的变形链球菌突变株。此突变株不能合成水不溶性葡聚糖,在存在蔗糖的环境中也不能粘附于玻璃,进一步印证了此酶在细菌粘附牙面中的重要性。

在 gtf B 基因的测序过程中,发现了另一个与 gtf B 基因序列极为相似、但位于 gtf B 基因下游的开放阅读框架,此即 gtf C 基因。之后,gtf C 基因被两个独立的研究小组成功克隆并测序,发现它主要是编码分子量为 150 kDa 的酶,主要催化合成水不溶性的细胞外葡聚糖,同时也可以催化少量的水溶性细胞外葡聚糖的合成。缺乏 gtf C 基因的突变株不能在光滑的表面定植。将此基因与 gtf B 基因在核酸水平比较,结果发现,两个基因在信号序列(内部的 300 bp 及碳末端附近的直接重复单位上)几乎是相同的,而且,gtf C 没有独立的启动子。提示 gtf B 与 gtf C 共享调节序列,并由同一启动子调控。经过多年的研究,认识到变形链球菌缺乏蔗糖依赖性的自发突变株的分离率很高。Ueda 及 Kuramitsu 证实这些突变是 gtf B 和 gtf C 基因特异性重组的结果。

进一步的观察发现,gtf B 与 gtf C 同时缺失的变形链球菌突变株仍然能够合成野生型水平的水溶性葡聚糖,提示有第 3 种葡聚糖酶的存在,此即 gtf D。gtf D 是由抗 gtf D 基因产物的抗血清从 gtf B 和 gtf C 中分离出来。克隆到的 gtf D 基因产物(分子量为 155 kDa)无一例外地具有在引物引导下合成水溶性葡聚糖的能力。gtf D 的插入性失活不影响变形链球菌在有蔗糖存在的情况下粘附于玻璃的能力。这些数据进一步为证明水不溶性葡聚糖在变形链球菌定植于牙面中的重要性提供了佐证。

以后再次构建的具有 3 种 gtf 缺失的突变株能够消除所有的 GTF 活性,提示没有其他的 GTF 基因存在了。gtf D 需要进一步测序,以明确其与 gtf B 和 gtf C 的关系。

在远缘链球菌中首先克隆到了 gtf I 和 gtf S 基因。它们分别编码合成水不溶性和水溶性葡聚糖。gtf I 基因的特性已基本清楚并且测序成功。将 gtf I 与 gtf B 比较的结果显示,在核苷酸序列与氨基酸序列方面具有广泛的同源性(大约 57% 以上)。两种蛋白质在碳末端都具有核酸重复序列,但此序列对于它们的酶活性并非必需。Southern 杂交分析显示,gtf S(远缘链球

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

菌)与 gtf D(变形链球菌)基因没有同源性,尽管它们编码的酶都具有相似的活性。更进一步的比较得待这些基因的核苷酸序列完全确定之后进行。

目前,GTFs 基因序列研究成果推动了构建缺失一种或多种 GTF 基因的变形链球菌突变株。但这些突变株须在动物模型上测试,以确定什么基因在此细菌的致病过程中起决定性的作用。尽管水不溶性细胞外多糖显得最重要,但确定水溶性细胞外多糖所起的作用也具有一定的意义。更为重要的是,这些菌系需测试其突变株合成的葡聚糖的种类和水平。有资料显示,编码水不溶性葡聚糖基因的失活导致水溶性葡聚糖合成的大量增加。相似的结果在 ftf 突变中也同时观察到了。由于这些基因已经被克隆,进一步的工作则是了解这些基因是如何表达的,以及它们的产物是如何调节的。

3.*果糖基转移酶(FTF)及葡聚糖粘附蛋白*　另一类口腔链球菌产生的细胞外酶是果糖基转移酶(fructosyltransferase)。此酶能将蔗糖裂解后产生的果糖合成果聚糖多聚体。已从变形链球菌克隆到并测序一种 ftf 基因。但由于蛋白水解作用,此酶的精确大小难以确定,序列资料预测此蛋白的分子量应有 88 kDa。与 GTF 基因一样,它的开放阅读框架附近可形成操纵子的一部分。

从唾液链球菌中克隆到另一编码 FTF 活性的基因。但此基因的产物——果聚糖的链接与从变形链球菌来源的不同。现已认识到,在口腔内不能获得其他的碳源时,果聚糖是变形链球菌在细胞外的储存化合物。但 ftf 基因产物对宿主的生存和(或)毒力是不是必需的,则还不完全清楚。有研究显示,变形链球菌 FTF 缺失突变株 V403 较其母代的毒力更低。

另一个从变形链球菌克隆到的基因是 gbp 基因,此基因编码葡聚糖粘附蛋白。此蛋白与变形链球菌粘附于葡聚糖,进而粘附于牙面的能力有关。有趣的是,此基因产物的分子量为 74 kDa,并与 FTFs 功能有关。比较 ftf 和 gbp 的限制性酶切图谱,显示二者是不相关的。它们的 DNA 也不杂交,基因产物在抗原性上也是不相关的,只是二者的功能都是将蔗糖裂解后形成的果糖合成果聚糖,但只有 gbp 基因产物粘附于果聚糖。与克隆到的 ftf 基因产物不同,克隆到的 gbp 基因产物没有酶学活性。

4.*糖苷酶、果糖酶、蔗糖酶*　其他几种细胞外酶的基因亦已成功地克隆,这些酶可能具有辅助链球菌在口腔内生存的作用。已从远缘链球菌中克隆到具有糖苷酶活性的 dex 基因。它编码一种具有酶学活性的蛋白质,分子量为 160~175 kDa,此酶可能参与调节 GTF。

另克隆一个 fru A 基因,它编码分子量为 140 kDa 的胞外 β-D-果糖酶。该酶能降解果糖,使细菌可利用释放的单糖作为碳源。

从唾液链球菌中尚克隆到蔗糖酶基因,它与酵母菌的转化酶(invertase)基因不发生杂交。此基因产物的作用可能在于使微生物利用蔗糖作为碳源。

(二)细胞内酶

1.*蔗糖 PTS 途径相关的酶*　变形链球菌实际上只利用约 5% 的可得到蔗糖合成多聚物。许多蔗糖通过糖酵解途径被利用,形成终末产物乳酸。蔗糖进入细胞的一条途径即是经过 PEP 依赖的 PTS 途径,此过程中蔗糖被磷酸化、并被转运进细胞,然后被水解。从变形链球菌中克隆到两种基因与蔗糖的 PTS 途径有关。scr B 基因是首先被分离得到的。它由两个研究小组在 1986 年独立地克隆到。scr B 基因编码 6-磷酸蔗糖水解酶,此酶分解进入细胞后的磷酸化蔗糖,使其成为有用的碳的代谢形式。scr B 的基因序列已经确定,蛋白质的分子量估计约为 52 kDa。其核苷酸与蛋白质显示与枯草杆菌的 sac A 蛋白具有相似性。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

另一已被克隆并被分离到的基因是 scr A。此基因编码蔗糖特异性酶Ⅱ，此酶与细胞膜有关，负责转运磷酸化蔗糖跨过细胞膜。此基因位于 scr B 的上游，按 scr B 基因的相反方向及相对的链进行转录。scr A 基因产物的分子量是 70 kDa，并与大肠杆菌及枯草杆菌基因的等位点具有相似之处。scr A 与 scr B 基因的任何调整都会影响到变形链球菌在牙齿表面的生存及使釉质脱钙的能力。

2.*天门冬氨酸－半醛脱氢酶*(aspartate－semialdehyde dehydrogenase)　已从变形链球菌克隆到 asd 基因，此基因编码分子量约 40 kDa 的蛋白质。该克隆到的基因能够完成天门冬氨酸－半醛脱氢酶缺陷大肠杆菌株的功能。此酶涉及到几种氨基酸的生物合成途径。此基因已经测序，结果显示，在 asd 启动子前方存在着调节区域。

3.*Don 核酸外切酶*　采用酶学筛选方法(enzymological screening method)，在血链球菌重组 λ 噬菌体文库中，测定到一种具有核酸外切酶活性的脱氧核糖核酸酶基因。此基因命名为 don。don 的产物是分子量约 34 kDa 的蛋白质，此蛋白质能降解 DNA。don 缺陷株对紫外线及化学致突变剂高度敏感。通过 DNA 杂交，在肺炎链球菌(*S.pneumoniae*)和远缘链球菌的菌系中也发现了与 don 相似的序列。

4.*半乳糖代谢相关的酶*　在含有来源于变形链球菌的 DNA 的重组质粒中，分离到一种能使 galKTE 突变的大肠杆菌突变株的缺陷得以补偿的基因片段。小细胞分析(minicell)显示，这种质粒编码 3 种分子量分别为 14,16 和 40 kDa 的蛋白质。推测这些克隆到的基因编码与半乳糖代谢中塔格糖磷酸化途径相关的酶。

5.*乳酸脱氢酶*　通过使用 N－甲基－N－亚硝基胍(N－methyl－N－nitrosoguanidine)处理得到了变形链球菌乳酸脱氢酶缺乏突变株。此突变株在动物模型上的致龋能力较野生型菌系明显降低，提示此基因产物是一种毒力因素。

6.*氟抗性*　将具有氟抗性的变形链球菌菌系中获得的 DNA，用来转染同菌系氟敏感型细胞，结果发现，形成的部分转化子显示了氟抵抗力。该结果使克隆这些表型现象决定子的工作提到了议事日程。

(三)表面蛋白与粘附素

1.*表面蛋白抗原*　变形链球菌的细胞壁蛋白成分由于与亚单位疫苗密切相关，因此成为观注焦点之一。这些蛋白较大，分子量约有 200 kDa，能诱发对口腔链球菌的强免疫反应。spa A 基因(又称为 pac 基因)已由 3 个研究小组相继独立克隆成功。令人惊奇的是，与多数其他的变形链球菌的细胞外蛋白不同，克隆到的 spa A 基因产物是被输出到大肠杆菌的外周胞质(periplasm)。这种基因在远缘链球菌中高度保守，但在其他的变形链球菌中则只是轻度保守。

另一个基因 spa P1(pag)也已克隆，此基因编码变形链球菌的抗原 P1(抗原Ⅰ/Ⅱ)。此基因的限制性酶谱与 spa A 完全不同，尽管它们的抗原性具有关联。与 spa A 中发现的一样，spa P1 基因在变形链球菌中高度保守，但在其他的变形链球菌菌系中保守性则不是很强。DNA 杂交及序列分析显示，spa A 和 spa P1 基因的内在区域中 62% 的核苷酸具有同源性。

2.*粘附蛋白*　在血链球菌中克隆到的 ssa A 基因，与血链球菌的纤毛(fimbriae)有关。此基因编码分子量约 30 kDa 的蛋白质，可与抗纤毛的血清发生反应。ssa B 基因编码另一种蛋白质，也与血链球菌粘附于牙面有关，其分子量为 36 kDa，能够在野生型和非唾液聚集的血链球菌中测到。而且，ssa B 基因产物的抗血清能抑制细菌对唾液包被过的羟磷灰石表面的粘附。在粘附过程中，ssa B 基因与 ssa A 基因产物所起的作用不同。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

血链球菌的表面抗原基因(ssp5)亦已被克隆,此基因产物介导钙依赖细菌对人类唾液凝集素的粘附。这种凝集素可以被牙面获得,并被血链球菌在定植过程中利用。ssp5 基因在大肠杆菌中的表达产物是分子量为 165 kDa 的蛋白质,能与完整的细胞竞争粘附于凝集素。克隆基因产物的抗血清能与血链球菌表面分子量为 205 kDa 的表面蛋白及远缘球菌的 spa A 蛋白质发生交叉反应,说明这些蛋白质在口腔链球菌中是保守的。

另一与 ssp5 具有相似功能的基因也从血链球菌克隆,并被命名为 adh。此基因表达 β-半乳糖酶融合蛋白,克隆到的链球菌基因产物的分子量为 84 kDa。此产物与纯化血链球菌分子量为 80 kDa 的表面蛋白抗原(与血链球菌粘附于唾液包被的羟磷灰石)具有交叉反应。因此,进一步确定上述两个基因的产物是否相同,或是两种不同的蛋白质但具有相似或相同的功能,将会是很有意义的。

(四)疫苗与替代疗法

随着重组 DNA 技术的发展,几种安全有效的途径被用于抗龋。一种策略是替代治疗,即用相同菌系的非致龋菌替换口腔中的正常菌群。为了达到此目的,替换菌系在生长能力上必须较野生型菌更优。现分离到几株变形链球菌,它们能产生细菌素,使其在口腔中的生存居于优势地位。有可能从遗传背景上改变这些细菌,减轻其毒力。同时,细菌素基因也可能被克隆,然后使其过表达于非致龋的细菌株。

目前正在积极研究的另一防龋途径,是发展新型的低诱导自身免疫、高引导有效的抗龋免疫反应的疫苗。采用链球菌单一成分取代全细胞达到了第一个目的。随着变形链球菌几种重要基因的克隆,使实现这条途径的可能性增大。目前,主要的候选基因是两个表面蛋白抗原——spa A、spa P1,以及 gtf B 蛋白,前二者具有免疫源性,而 gtf B 蛋白是重要的毒性因子。这些蛋白质能够通过分子途径过表达,并加以改进,以增强其作为亚单位疫苗的应用。第二个目的,诱导有效的免疫反应取决于选择的载体。Curtiss 将 spa A 基因表达于沙门菌系,使其在肠道中长久地生存,以引导对此抗原的免疫反应而不引起疾病。另有资料报道,将 gtf B 蛋白的免疫源性区域与霍乱毒素的 B 亚单位 N 末端融合。以霍乱毒素为载体,作为链球菌抗原口服亚单位疫苗,已被证实是行之有效的途径。

第二节 牙周厌氧菌的分子遗传与分子生物学

一、总 论

牙周组织疾病是由于局部细菌感染性炎性反应,造成宿主牙槽骨与结缔组织破坏的结果。下列 3 类特异性的微生物被认为与破坏性牙周病病原相关:牙龈卟啉单胞菌(又名牙龈紫质单胞菌 *porphyromonas gingivalis*, Pg),中间普氏菌(*prevotella intermedia*, Pi)及伴放线放线杆菌(*actinobacillus actinomycetemcomitans*, Aa)。

在这一部分,我们简要地总结分子生物学研究工具与途径,在研究牙周微生物中获得的初步成果。研究认为,从口腔中分离到的许多细菌,其相互间或种属内部在体外具有相互作用。这些作用包括相互提供营养物质、共聚、毒性产物相互拮抗等。这些相互作用可能在细菌的定植,牙菌斑的发育及其随后的致病中起作用。从口腔中最常分离到的厌氧菌是能产黑色素的普氏菌属和卟啉单胞菌属杆菌。这些微生物,在血平皿中产生棕黑色克隆,与口腔及非口腔部

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

位的厌氧感染有关。产黑色素普氏菌的基本生物学及与人类疾病的关系请见本书的其他相关章节。牙龈卟啉单胞菌和中间普氏菌的致病作用,主要是因其具有:产生一种物质刺激或抑制同一部位的其他微生物;刺激或抑制宿主的组织生长;粘附宿主蛋白或细胞;粘附宿主的可溶性蛋白如纤维蛋白原等能力。

拟杆菌、普氏菌、卟啉单胞菌过去均被称之为“类杆菌”,该微生物实际上是一大群革兰阴性、具有厌氧倾向、无孢子形成、外形呈棒状的细菌。主要位于口腔和结肠。现已将拟杆菌(*Bacteroides*)用于命名脆弱拟杆菌(*Bacteroides fragilis*)及与其密切相关的从下消化道分离到的菌系。从口腔中分离到的卟啉单胞菌(*porphyromonas*)与牙周病有关。

由于这些微生物与遗传背景关系密切,因而卟啉单胞菌毒力确定子的分子分析难以进行。因此,已成功应用于革兰阳性或革兰阴性的质粒载体及抗生素抗药性标记,还没有被广泛地应用于拟杆菌或卟啉单胞菌菌系的研究。但因为消化道的拟杆菌菌系的氧耐受力更高,具有更短的生长周期,更容易在化学培养基中生长,所以许多分子或遗传性的研究工作资料来源于这些细菌的研究。由于缺乏转导阶段及天然的转导系统,因而未能广泛地研究拟杆菌的经典遗传分析,而其分子遗传学研究,则在可用于构建载体的分子成分发现后,才得到了极大的推动,这包括可转移性克林霉素抗药性基因(Cc^r)拟杆菌的发现、各种小质粒制备的可能等。

二、实用性分子成分

Cc^r 转移可通过质粒与非质粒途径进行。质粒介导的 Cc^r 研究较多。在与质粒相关的情况下,Cc^r 是由交合性转位子携带。Cc^r 基因(又称为 erm F 和 erm FS)及其侧翼的 DNA 序列分析,提供了 Cc^r 基因表达所需条件的资料,以及相关拟杆菌插入序列(IS)成分的构造情况。Cc^r 作为选择标记已被用作构建各种用途的穿梭载体。典型的穿梭载体具有分别在大肠杆菌及拟杆菌中的复制功能,以及相应的选择性抗生素培养基。已成功地将质粒 DNA 转染到了脆弱拟杆菌,而且已构建了几个穿梭载体,这些载体含有从大肠杆菌到拟杆菌的高频交合转移性质粒,它们以大肠杆菌的广谱宿主质粒为辅助,为穿梭质粒提供转移功能。

我们对厌氧菌的非质粒相关抗生素抗药性转移的了解非常有限。但已认识到 65% 的临床肠道拟杆菌分离株中含有四环素抗药性基因(Tc^r),而且,Tc^r 的转移是通过交合样机制发生,与质粒无关联。大多数情况下,携带这些四环素抗药性片段(TET)的转移频率可以通过四环素预处理而增加。TET 成分被认为能与同一细胞的其他 DNA 成分发生相互作用,如能加速交合时质粒的运动能力及介导从染色体切除环状 DNA 的能力。一些菌系则显示了与克林霉素抗药性的传递相关联。此外,尽管四环素抗药性在大肠杆菌中并不表达,但 TET 成分能加速拟杆菌的 DNA 转导到大肠杆菌。

在产黑色素的普氏菌及卟啉单胞菌中,无论是染色体介导的还是质粒介导的遗传功能,对其知之更少。在口腔内的普氏菌中,质粒并不常见。现在发现有 3 种菌系含有质粒,大小约为 4.2 kb。Guiney 及同事已证实,在两种独立的普氏菌及卟啉单胞菌菌系中存在着交合转移系统。一株具有青霉素抗药性(Pn^r)及 Tc^r 的栖牙普氏菌(*P. denticola*),能够将 Tc^r 转移到口腔颊普氏菌(*P. buccae*)之中。业已证明口腔菌系中间普氏菌(*P. intermedia*)能将 Tc^r 转移到颊普氏菌。有意义的是,两种情况下,Tc^r 转移都与 Pn^r 抗药性的共转移有关,提示两种抗生素抗药性标记决定子是相互连接的。

从栖牙普氏菌转移 Tc^r 到无关系的脆弱拟杆菌时,其频率要低 100 倍。转移过程类似于

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

肠道脆弱拟杆菌群微生物中的交合样过程。并且在任何情况下，Tc^r 的转移都伴随着从脆弱拟杆菌染色体中克隆到的、与 Tc^r 基因决定子同源的 DNA 序列的转移。提示在口腔内的普氏菌中可转移性 Tc^r 与肠道脆弱拟杆菌群的可转移基因相似。临床口腔内的普氏菌分离株中，约有 27%对四环素具有抗药性，提示胃肠道的拟杆菌和口腔的普氏菌具有天然的可转移遗传性物质。这些结果提示可将在胃肠道拟杆菌研究中获得的遗传系统应用于口腔的普氏菌研究。

三、克隆及插入突变

在拟杆菌、普氏菌及大肠杆菌中均已证实了 Tc^r 转位子与其相关的 IS 成分的转移，从而建立了口腔厌氧菌插入突变分析的可行方法。分子遗传的核心之一，即是在另一宿主细胞中表达并研究克隆到的基因。在革兰阴性细菌中，宿主菌通常即指大肠杆菌。尽管初期的研究显示拟杆菌和普氏菌的 Tc^r基因在大肠杆菌中缺乏表达，拟杆菌和普氏菌的 TEM β－乳糖苷酶在大肠杆菌中亦缺乏表达，使拟杆菌和普氏菌中克隆到的基因在大肠杆菌中表达的可行性受到了怀疑，但现在各种肠道拟杆菌基因已经被克隆并表达于大肠杆菌中。这包括在多数菌系中都相当保守的谷氨酸合成酶及 rec A 样基因等。几个来源于反刍动物肠道的产琥珀酸弯曲菌（*C. succinogenes*）和栖瘤胃普氏菌（*P. ruminicola*），以及来源于多形拟杆菌（*B. thetaiotaomicron*）的基因已被克隆并已弄清其特征。这些基因产物是复合多糖降解为单糖所必需。由于上述各基因都能被其启动子引导，且在大肠杆菌中表达，在某些情况下还能看到表达调节的存在，因此说明，在大肠杆菌中实现拟杆菌和普氏菌基因的表达是有可能的。

四、口腔内的普氏菌及卟啉单胞菌

研究发现，牙龈卟啉单胞菌除具有其他细菌的致病性特征外，还具有其他的致病性物质，包括结构成分如纤毛等。产黑色素类普氏菌和卟啉单胞菌产生的物质中，具有酶学活性的超过 17 种，包括细胞外蛋白酶、胶原酶和明胶酶，这些物质与组织破坏有关。另外还认识到，这些细菌能产生特殊的具有改变宿主免疫防御功能的物质，这些物质能降解免疫球蛋白、血清蛋白酶抑制剂、纤维蛋白原、铁转运胞浆蛋白、补体 C_3 和 C_5 蛋白等。由于缺乏适当的研究工具，这些蛋白成分决定子的遗传分析的研究曾一度受限。同时，由于缺乏从单一途径获得与母代不同的特殊的突变子的途径，企图将某种细菌的特性与毒力相关联的研究也一度受限。分子遗传技术的运用允许构造一系列的只是在某一个特点上不同的菌系后，才出现了使这些问题得到解决的可能。Holt 等的工作证明，将用遗传工具标记的牙龈卟啉单胞菌菌系种植到猴模型，可快速导致有意义的骨丧失，并伴有系统性抗体水平的增加。

纤毛附着于细菌细胞壁的外层，常常在加速细菌粘附于宿主或其他细菌的毒性作用中起作用。牙龈卟啉单胞菌编码纤毛亚单位的基因已经克隆到大肠杆菌中，并用对来源于 381 菌系纯化的纤毛蛋白的氨基酸末端氨基酸序列具有反应的混合性寡核苷酸探针核定。DNA 序列分析后，显示其密码与其他高表达的细菌基因相似。但其密码较其他菌系更为频繁地出现在此基因中，提示相对富含 tRNA。潜在的起始位点含有一可接受的、能在大肠杆菌中表达的 Shine－Dalgarno 序列及起始密码（GTG）。Southern 分析显示，10/10 的牙龈卟啉单胞菌及0/8其他的口腔内普氏菌具有与克隆基因 DNA 序列同源的序列。这些工作开创了一旦具有将 DNA 引导进入此菌系的方法，即可构造其特异缺乏纤毛合成突变株的工作途径。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

五、放线菌

大量的放线菌是在人类牙菌斑中发现。由于该微生物能粘附于各种宿主的组织或其他细菌的物质表面,可在口腔中定植并繁殖。尽管导致这些相互作用的表型已有较多的研究,但对这些相互作用的分子与遗传基础了解甚少。对粘性放线菌(*Actinomyces viscosus*)的研究,开创了这种相互作用分子基础的研究。粘性放线菌具有粘附于唾液包被过的羟磷灰石的能力,此特点与细胞表面的Ⅰ型纤毛有关。一种Ⅰ型纤毛的粘附受体是唾液中酸性富脯蛋白,缺乏Ⅰ型纤毛合成的突变株不能粘附于这些蛋白质。放线菌粘附并集聚链球菌的过程是一个复杂的过程,存在着明显的交互作用,而对多数这些交互作用则知之甚少。粘性放线菌上存在的Ⅱ型纤毛,与特殊的血链球菌菌系中存在的乳糖可抑制粘附有关。这些相互作用的遗传基础刚开始被揭开。粘性放线菌Ⅰ型和Ⅱ型纤毛的结构基因近期被克隆并被表达于大肠杆菌之中。从粘性放线菌分离到的抗纤毛蛋白抗体已被用于分离缺乏Ⅰ型或Ⅱ型或两者均缺乏的自发突变株。这些突变株的特性印证了Ⅱ型纤毛与粘附于血链球菌乳糖的敏感性粘附关系。不表达Ⅰ型纤毛的突变株不再粘附于唾液包被过的羟磷灰石上。不表达Ⅰ型或Ⅱ型纤毛的突变株仍然能与血链球菌的J22菌系聚集。此过程需要由链球菌及放线菌表面受体产生的乳糖抗性血凝素。内氏放线菌(*A. naeslundii*)Ⅱ型纤毛结构基因已被克隆,并在其自身的启动子的控制下表达于大肠杆菌。DNA序列分析发现,此基因具有潜在的表达放线菌基因的信号,包括启动子、核糖体粘附位点、32个氨基酸的信号序列,以及一个二级结构区(相似于大肠杆菌rho-独立的转录终止结构)。

六、放线杆菌

伴放线放线杆菌(*Actinobacillus actinomycetem comitans*, Aa)是一种革兰阴性菌,与青少年牙周炎的发生有关。此微生物可产生具有很窄的特异性靶细胞的、热不稳定的细胞毒素(白细胞毒素)。该细胞毒素能在体外杀死人类的多核细胞及单核细胞,但对来源于其他动物的细胞则无作用。其他类型的人类细胞,包括成纤维细胞、内皮细胞、上皮细胞及血液白细胞,亦不受此毒素的影响。最近有两个研究小组已经成功地将Aa白细胞毒素基因克隆到了大肠杆菌。Kolodrubetz等通过DNA杂交,确定此基因与溶血性巴斯德杆菌(*Pastuerella haemolytica*)的毒素有关,并显示,克隆的片段产生的细胞毒素可导致敏感细胞(THP-1)株的铬释放,但对抗性株(K562)却没有影响。克隆的毒素仍然具有热不稳定性。Southern杂交分析两个无关菌系,显示其毒素基因具有HindⅢ限制性内切酶位点变异,但并不影响毒素功能。Lally等,通过测定基因组文库,获得了表达部分同一基因的克隆,此克隆与纯化的Aa多克隆抗血清起反应。与抗体发生反应的多肽已被证明是粘附Aa的毒素。两组人员从有限的DNA序列资料分析证实,嗜血卟啉单胞菌(*P. haemolytica*)白细胞毒素基因与大肠杆菌溶血素(*hemolysin*)基因具有相似性。提示这些分子形成了一个相关联的细胞毒素家族,这些毒素具有相同的作用机制,但却具有明确的不同的细胞特异性。与其他的细菌研究一样,一旦在此菌系中能发现合适的基因转移方法用以构建突变株的时候,即可从中获得有用的遗传研究工具,而且这些毒素特异性探针将会应用于临床诊断领域。

Hillman和Shivers证实了Aa与血链球菌相互作用的复杂性。以前只观察到血链球菌可抑制Aa生长,现证实该能力与血链球菌产生过氧化氢有关。一株因缺乏丙酮酸氧化酶活性而不

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

能产物过氧化氢的血链球菌突变株,不具有溶血性,也不能抑制 Aa 的生长。进一步将野生型、过氧化氢酶缺乏的突变株或过氧化氢酶缺乏的回复突变株引导到定菌鼠,以观察与 Aa 的作用获得的结果仍证实,野生型与回复突变株不同,过氧化氢酶缺乏的突变株亦不能抑制 Aa 的生长。

七、拟杆菌等位交换突变

在厌氧菌中创造等位交换突变株的遗传方法的设想,来自于某些拟杆菌菌系的研究系统。多形拟杆菌(*B. thetaiotaomicron*)含有能降解硫酸软骨素(一种在结肠中存在的粘多糖)的两种酶。编码软骨素分解酶Ⅱ(CSaseⅡ)的基因已被克隆,特性亦被弄清。克隆的 DNA 片段分析表明,CSaseⅡ基因与编码软骨-4-硫酸酶(chondro-4-sulfatase,另一个降解途径中需要的酶)基因相邻,克隆片段被插入大肠杆菌—拟杆菌载体 pE3-1,并与 IncP 质粒 R751 一起转移进入了拟杆菌。通过载体上的红霉素抗药性基因的选择,将基因插入染色体拷贝,导致了插入失活。然后在体外及无菌鼠体内研究了 CSaseⅡ对整个硫酸软骨素利用的作用。特征分析显示,除了一项明显的改变外,与母代相同,即硫酸软骨素的利用不再需要 CSaseⅡ。

编码催化多糖生成麦牙三碳糖(maltotriose)的酶,其出芽短梗孢糖酶(pullulantase)基因被克隆到了大肠杆菌之中。在大肠杆菌中,酶在插入性启动子的作用下表达。此基因通过克隆此酶到含有 erm F 基因作为拟杆菌的选择性标记的自杀性载体,被用于插入性失活多形拟杆菌基因的染色体拷贝中。自杀载体通过应用 IncP 辅助性质粒 R751 提供转移因子,从大肠杆菌中移动到母代菌系中。突变株仍然具有 45%的野生型出芽短梗孢糖酶活性,提示该微生物具有超过一个以上的出芽短梗孢糖降解酶。这些研究说明,使用交合移动系统将克隆序列转引入它们原来的宿主细胞,以便通过等位交换构建特异性突变株。我们推测,从胃肠道菌群研究中所获得的相似的工具,同样也适用于口腔内的普氏菌的研究。

八、诊断探针

判定与牙周疾病相关的因素,取决于培养微生物的能力及进行生物化学测试的能力。厌氧培养较单调耗时,不适用于精细程度的研究。基于这些原因,研究不需要微生物生长的诊断测试方法具有广泛的用途。现已有两种方法被用于测定厌氧性牙周致病微生物。一种方法是免疫测定法,即采用多克隆或单克隆抗血清测定并定量病损牙周中的特异性微生物;第二种方法是采用 DNA 探针测定牙周病原菌。按目前的分类,中间普氏菌包括了两类在表型上不能完全分开的微生物,而它们的 DNA 却只有 40%同源。进一步研究发现,Ⅱ型可能较Ⅰ型在牙周病的发病中具有更为重要的作用。Moncla 等成功地将Ⅰ型或Ⅱ型中间普氏菌的全细胞 DNA 应用于确定临床分离株。检查 253 株被认为是中间普氏菌的菌系,结果 67%与Ⅰ型探针发生反应,11%与Ⅱ型探针发生反应,9%与其他的拟杆菌探针发生杂交。在分离株中,13%未能与任何目前研究的探针发生杂交。全细胞 DNA 通过点杂交方式也被应用于确定拟杆菌菌系。

九、牙周细菌的传播

病原菌的存在是牙周病发生的前提,但病原菌的定植并不一定引起牙周膜的破坏。目前,对于某些牙周致病菌是内源性或外源性的感染还存在着争议。例如,有的研究者认为牙龈卟啉单胞菌和 Aa 是外源性的,其根据是因为这些菌具有下列特点:常常伴随着疾病而出现;在大

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

多数正常个体中不能培养出来；常引发显著的抗体反应；治疗后通常伴随着培养转阴。但另外的学者却从以下证据认为它们是内源性的感染：这些微生物常常在具有或不具有牙周病症状的病人口腔中探测到；采用的传统培养方法可能过低地估计了它们在正常人口腔中的检出率，而新的、更敏感的测定方法，如 DNA 探针技术会具有比培养方法高出 10 倍以上的检出率。另外还有研究证实，外源性牙周病原菌更易是由一种或少数几种克隆型组成，而内源性病原菌则通常由多种克隆型所组成。目前已有足够的证据证明潜在的牙周病原菌通常是杂合性的，并由多种克隆型组成。

弄清牙周感染通常是由普通内源性或外源性微生物所致具有重要的临床意义。因为它具有治疗提示性作用，假如牙周感染是内源性细菌过度增殖所致，则传播就不是一个重要的问题；而且假如这一概念正确的话，病原菌则仅需要抑制而不是清除；另一方面，假如特异的外源性细菌对感染来说是必需的，则细菌的传播对疾病的起始、传播途径的阐明将是重要的一环，因为，对此问题的研究可以打破感染链。为了帮助了解细菌是外源性或内源性的问题，可采用敏感的方法如聚合酶链反应，在普通人群中调查以确定潜在病原菌的流行频率，并弄清所谓的低水平的病原菌与疾病发生的关系；同时亦需要确定是否有被认为是内源性的菌系具有在普通人群中通常未被发现的毒力因子的遗传表型。特异的遗传型将会被认为是外源性的致病因子。这种可能性可通过分析来源于健康个体及牙周炎患者的大量病原菌的遗传型而加以确定。

在此，我们简要地总结口腔分子生物学的初期结果，须注意的是，这方面的文献报道较少，因此，本部分的内容还应对照其他专著有关牙周病的细菌病因学及发病机制研究的相关内容。

（一）同一菌系中不同细菌间的鉴定

目前，许多遗传型和生物型方法已被用于确定同一菌系间的不同细菌。传统的表型确定方法如血清型或生物型，对于分辨细菌是重要而实用的，但是，对于研究细菌的传播途径却不适合，因为它们不能够识别同一菌系间不同型别细菌的遗传杂合性。

相反，微生物遗传学的进展提供了更敏感的、鉴别同一菌系间的细菌的方法，例如全染色体 DNA 的限制性内切酶分析、采用核糖 DNA 与 DNA 片段杂交的核糖分型、采用任意引物对 DNA 片段进行 PCR 扩增(RAPD)等等。其中最普遍采用的方法是限制性内切酶分析(REA)，即研究细菌菌系 DNA 指纹的方法。该技术采用特异的核酸内切酶，切割特定核酸碱基序列之间的基因簇 DNA，然后采用凝胶电泳分离这些片段，并用溴乙啶染色。所得到的电泳带图谱即代表了能够通过肉眼阅读或采用激光密度仪测量的 DNA 指纹。通常，假如两种细菌的分离株显示了不同的 REA 图谱，它们被认为是不同的；然而，假如两种图谱相同，则不能完全肯定它们是来源于同一克隆。因为，假如特定的微生物菌系具有限制性遗传多态性(limited genetic diversity)，即有可能获得相似的带型图谱，此时即需进一步选用其他的分型方法进行鉴别。

（二）人类之间的牙周细菌传播

由于 Aa 和 Pg 与人类牙周疾病的相关率较高，因此，研究细菌的传播通常选用这两个细菌为研究对象。现在，牙周细菌的传播研究已在以下几个方面进行了一些工作：配偶间的水平传播、父母与儿童间的垂直传播、儿童间的交叉传播，以及动物与人类间的传播可能性等。

1．**配偶间的水平传播**　Offenbacher 等评价了 14 对夫妇的细菌表型。他们报道，假如一方具有中等量的螺旋体，则在配偶的另一方具有相似量螺旋体的可能性是无关人群的 3 倍以上；同样，假如配偶一方具有纤毛，则在配偶的另一方中分离到相同微生物的机率将比无关人群高

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

出 30%。这些数据提示,家庭中存在着细菌传播的可能。但是表型判定的不精确使这种传播是不是交叉感染的解释得不到肯定。而且,配偶间细菌表型相似的结果,还有可能由于相似的口腔卫生习惯或其他因素(如相同的食物和水)所致。

采用更为成熟的技术评价微生物在配偶间传播的研究结果列于表 4-5。Van Steenbergen 等评估了 18 位感染有 Pg 的青少年牙周炎患者,采用培养技术发现其父母中有 10 对夫妇也感染有 Pg。此 10 对感染了 Pg 的夫妇中有 8 对接受了遗传表型分析,结果发现,6 对夫妇的限制性酶切图谱相似,另外两对虽然也感染了 Pg,但其 REA 的图谱与其配偶不同。这些交叉感染的夫妇有可能是通过不同的途径获得相似的微生物。

表 4-5 配偶间细菌的传播

研究者	配偶一方所患疾病	微生物	配偶另一方感染相同微生物的生物型或遗传型比率	采用技术
Van Steenbergen 等	成年性牙周炎	Pg	6/18 (33%)	REA
Petit 等	成年性牙周炎	Aa	1/13 (13%)	REA
Preus 等	成年性牙周炎	Aa	1/9 (11%)	PCR
Alaluusua 等	成年性牙周炎	Aa	2/4 (50%)	血清型
Saarela 等	成年性牙周炎	Aa	2/4 (50%)	血清型
		Pg	23/4 (50%)	核糖型

Petit 等认为唾液可能是细菌传播的主要途径。他们报道与配偶中只有一方感染有 Pg 的患者对比,在配偶双方都具有相似的菌系时,唾液中的 Pg 计数更高。此外,唾液中 Pg 的量随着同居生活时间的增加而增加。然而,Pg 的水平与患者的年龄亦具有相关性,因此,不能完全将 Pg 量的增加归因于共同生活的时间长短。同时,研究数据表明,配偶中具有 Pg 定植或无 Pg 定植的牙周状态是相似的,提示潜在的病原菌的定植不一定会导致感染的发生,及继之而来的组织破坏。

几个研究评价了配偶间 Aa 转移的潜力(表 4-5)。Petit 等选择了 13 对感染了 Aa 的配偶,发现 4 对配偶具有 Aa 定植,但只有 1 对配偶具有相似的 REA 图谱。Preus 等报道,感染了 Aa 的 7 对夫妇中只有 1 对具有相同的扩增型(带型)。他们认为,这些夫妇口腔中定植的不同的 Aa,是在他们共同生活前即获得了。这一结论从另一个角度支持一个论点:一种克隆型在生态环境中的定植,将会预防或抑制另一种遗传表型不一样的同一菌系的细菌的定植。

总之,资料支持假如一方受染,配偶也具有被相似病原体定植的可能性。但采用分子遗传学印证的结果中传播机率却是较低的。另一方面,配偶分别获得病原菌也不能完全被排除,因为微生物可在家具或餐具中发现。感染后发病与否还取决于个体的免疫系统及微生物间的竞争等因素。

2. 父母与儿童间的垂直传播 局限性青少年牙周炎(LJP)具有家族性,提示微生物可能在家属中传播。为了确定此概念的确切性,Zambon 等从至少有两个成员患有 LJP 的几个家庭的家庭成员中分别分离 Aa,结果发现,在同一家庭中的不同成员所感染的 Aa 都显示了相同的血清型和生物型。在 2 个至少 1 个家长感染有 Aa 的家庭中,9 个子女中有 2 个感染了相同的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

Aa,并且其血清型与生物型均相似。在另外 2 个家庭中,几个儿童感染了 Aa,但父母却没有这些微生物。这可能系家族外的感染或家长一过性的感染后传播给子女。

表 4-6 细菌自父母传播给儿童

研究者	父母至少一方所患疾病	微生物	儿童感染相同微生物的生物型或遗传型比率	采用技术
Petit 等	成年性牙周炎	Pg	4/26 (15%) (4/13 家庭)	REA
Alaluusua 等	成年性牙周炎	Aa	3/18 (17%) (2/9 家庭)	血清型
DeRienzo 等	局限性青少年牙周炎	Aa	6/10 (60%) (3/5 家庭)	RFLP
Zambon 等	局限性青少年牙周炎成年性牙周炎	Aa	2/9 (22%) (1/3 家庭)	血清型
Preus 等	成年性牙周炎	Aa	8/33 (24%) (7/9 家庭)	PCR
Kononen 等	健康人	Pm	6/11 (55%) (6/11 家庭)	核糖型

此外,细菌从父母传播给子女的证据则由 Alauusua 等提供。他们评价了 3 类家庭,即儿童系 Aa 阳性、儿童系 Aa 阴性及父母系 Aa 阳性。他们发现,当孩子系 Aa 阳性,父母 Aa 阳性时,其血清型是相同的。

Petit 等采用分子遗传学技术研究发现,在 26 位感染了 Aa 的父母中,他们的 26 个子女中具有 Aa 定植,而且其限制性内切酶图谱都是相似的。同样,Preus 等发现,33 个儿童中 8 个感染了 Aa,其扩增型(生物型)与其父母是相同的。

上述证据均提示,儿童如果被病原菌感染,至少父母中的一方将会具有同样血清型的细菌。然而,细菌传播给儿童的机率却变化较大。而且,这些不是跟踪研究,感染的时间性也有待于进一步确定。另外,采用培养技术可能较 DNA 技术低估了细菌的流行情况。因此推测,垂直传播病原菌的可能性较以前想象的更为普遍。

3.儿童间交叉传播 为了评价微生物是否在同学之中传播,Van Steenbergen 等选择了 14~16岁的学生 87 位,其中 14 位显示临床附着丧失。对 10 个感染了 Aa 的学生采用 REA 分析细菌。当 Pg、Pi 和 Aa 能够查出的时候,每个儿童都显示了不同的图谱。因此,认为在学生中没有微生物的传播。

4.动物与人类间传播的可能性 Preus 和 Olson 报道患有 Papillon-Lefevre 综合征的孩子感染了 Aa,从遗传型上看,此 Aa 与狗是相同的。此后,在挪威其他地方养有狗的儿童身上,也分离到了与 Papillon-Lefevre 综合征儿童所分离到的遗传型一样的 Aa。DNA 指纹分析显示,儿童和狗都具有完全相同的 Aa DNA。由于这些儿童没有与别的儿童接触,因此解释为动物可以是细菌传播的载体。

综上,牙周细菌的家庭内与家庭外传播引起了研究人员的极大兴趣。最近的分子生物学进展为鉴别微生物是否系同一种菌系提供了可能,从而加速了有关牙周细菌传播的研究。目前所获得的证据显示,微生物在父母与子女之间的传播的可能性是非常大的。资料也显示了传播在配偶间的发生,但频率则不一定很高。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第三节　单纯疱疹病毒的分子生物学

单纯疱疹病毒(HSV)属疱疹病毒科(Herpesviridae)。本科中包括引起人类疾病的8种疱疹病毒:HSV-1、HSV-2,人巨细胞病毒(HCMV),水痘带状疱疹病毒(VZV),EB病毒,人类疱疹病毒6型、7型和8型(HHV-6、HHV-7、HHV-8)。HHV-6、7和8是近年新分离到的,对T细胞、B细胞、某些神经胶质细胞系、成纤维细胞等有嗜性,系DNA病毒。HHV-6可引起婴儿急疹等,并与免疫缺陷相关疾病有一定的关系。HHV-8被认为与人类免疫缺陷病毒(HIV)感染患者的卡波西肉瘤的发生有关。

HSV是最早发现的人类疱疹病毒。由于HSV可引起多种感染,可在宿主体内终身潜伏,且可在近原始感染部位被激活,故被用作研究膜结构、基因调控、病毒潜伏的工具。由于HSV的基因结构已研究清楚,加之可在其基因中插入外源基因,利用HSV可感染多种细胞,现已被考虑作为基因治疗的载体。HSV为有包膜的DNA病毒,病毒体直径约120~150 nm,包膜表面有突起,含有病毒的多种糖蛋白。包膜内为对称的20面体衣壳,内部为HSV DNA及DNA结合蛋白,在包膜及衣壳间为间层(tegument),厚薄不等,经负染电镜观察似为纤维状(图4-1)。根据HSV基因组不同的限制性内切酶图谱及病毒蛋白大小,HSV可分为HSV-1及HSV-2。此外,前一型病毒主要感染人腰部以上的粘膜及神经系统,后一型病毒是引起生殖道感染的主要HSV。

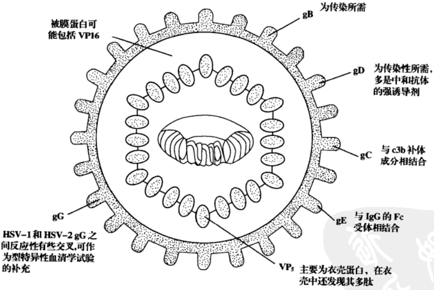


图4-1　HSV病毒体模式图及表面抗原的功能

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

一、HSV DNA 的结构与功能

(一)单纯疱疹病毒的分子结构特征

HSV DNA 为双链线形 DNA,在单纯疱疹病毒体内的 DNA 以环形、线形形式存在,线形的末端非常接近。一旦 HSV 进入感染细胞核内,其 DNA 立即进行环化。HSV DNA 长约150 kb,其 G + C 含量为 68 mol%(HSV - 1)或 69 mol%(HSV - 2)。HSV DNA 分子包含两个长(L)短(S)不同的并以共价键相联结的片段,分别占 DNA 的 82%与 18%。每个片段首尾核苷酸序列反向重复(IR),中间是独特的 UL 和 US 序列。UL 的首尾重复序列称 ab 及 b′a′,均占 DNA 的 6% 。US 的首尾重复序列称 a′c′和 ca,各占 DNA 的 4.3%(图 4 - 2、4 - 3)。由于 L、S 末端有互补的反向重复序列存在,L、S 之间可以以不同的方向相连,从而构成 4 种异构体。根据 L、S 段是否倒置,分别命名为原型,IL 型(L 段倒置),IS 型(S 段倒置),ISL 型(S、L 段均倒置)(见图 4 - 2,4 - 3)。不同病毒株在 L - S 连接区及在 L 末端的 a 序列重复的次数与其核苷酸序列是不同的,例如 HSV - 1(F)病毒株的 a 组成为:DR1 - Ub - DR₂ - DR4 - Uc - DR1[其中 DR1 为 20 bp 的顺向重复序列,Ub 为该病毒株特有的 65 bp 序列,DR2 是 1 个 12 bp 顺向重复序列(共有 19~23 拷贝这一序列),DR4 是 1 个 37 bp 的重复序列(出现 2~3 个拷贝),Uc 为该病毒株所特有的 58 bp 的顺向重复序列,最后又为 DR1 的 20 bp 顺向重复序列]。过去曾以为这些在 HSV DNA 内部的重复序列是必需的,但用缺失突变技术获得特有的序列或 DR 序列缺失的突变株,不论其为原型排列或 IL、IS、ISL,均能保持在细胞内增殖的活力。

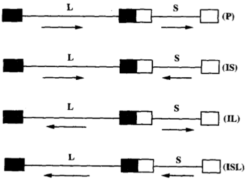


图 4 - 2　HSV DNA L 和 S 独特序列可能的不同排列

IS IL ISL 排列是由长和短序列转化而成,P 为原型排列

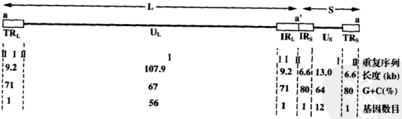


图 4 - 3　HSV - 1 基因组的结构

L:长片段;S:长单一序列;U_S:短单一序列;TR_L:U_L 末端反转重复序列;TR_S:U_S 末端反转重复序列;IR_L:U_L 中间反转重复序列;IR_S:U_S 中间反转重复序列;- 示单一系列;□示重复序列

对单纯疱疹病毒的基因结构与功能的分析主要通过以下几种途径:①获得突变株,提取

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

DNA 后用限制性内切酶消化成片段，转染细胞观察其表达产物；②用野生型病毒株的 DNA 片段与突变株的 DNA 片段共同转染细胞，观察前者对后者缺损部分基因的补偿或拯救作用；③提纯单纯疱疹病毒的 DNA 或 mRNA 进行表达；④在 1 型与 2 型病毒株间进行重组研究。在 HSV 中对比较重要的基因：α、β、γ 和 TK 基因已有所了解。α 基因共有 5 个，分成两群，定位于邻近 L 和 S DNA 片段的末端，每个 α 基因均有自己的启动调节区、转录起始与终末区。β 和 γ 基因则分散存在于 L 和 S 片段中，β 基因编码 DNA 多聚酶与 DNA 结合蛋白者位于 L 片段，而 γ 基因编码包膜蛋白者在 S 片段中 US 部分。HSV－1 的 TK 基因属于病毒的 β 基因。应用基因克隆发现，将 Bam Hi/Q 片段克隆入质粒 pBR322，转染大肠杆菌可获得 TK 基因的表达。用 Bam Hi－BgⅠⅡ去除 TK 基因上游的 800 个 bp 可增强 TK 基因的表达，因此说明 TK 基因 5′端有一影响其表达的调控区。TK 基因内有两个转录起始点，并发现分别自该两个起始点转录的 mRNA。虽然对其意义尚不明了，但由于 TK 基因代表了单纯疱疹病毒和真核细胞共有的基因，并可能与该病毒潜伏有关，故很受重视。

经过数年的艰苦努力。英国格拉斯哥大学病毒学研究所的 McGeoch 研究小组，已将 HSV－1 17^+ 株的 DNA 全部测序。该病毒株的 DNA 共含有 152 260 个核苷酸残基，其中碱性核苷酸即鸟苷酸和胞苷酸（G＋C）的含量较高，达 68.3 mol%。HSV－1 的基因组上，共排列有 72 个编码蛋白的基因，其中长单一序列（UL）上有 56 个，短单一序列（US）上有 12 个，UL 末端反转重复序列（TRL）、US 末端反转重复序列（TRS）、UL 中间反转重复序列（IRL）和 US 中间反转重复序列（IRS）上各有 1 个。由于 TRL 和 IRL 上各有 1 个 IE_{110} 基因，而 TRS 和 IRS 上各 1 个 IE_{175} 基因，所以 HSV－1 基因组的 72 个基因共编码 70 个各异的蛋白质（图 4－4）。

在 HSV－1 的 72 个编码基因中，约半数的基因转录时阅读方向是从左至右（右向），但有 37 个基因的阅读方向是从右至左（左向）。在所有基因 3′末端的上游，均有多聚腺苷化序列 AATAAA 或 ATTAAA 作为转录的起始。

HSV－1 基因的定位及其编码蛋白的特性与功能见表 4－7。迄今至少对其 24 个基因编码蛋白的特性与功能还一无所知，但对多数 HSV－1 编码蛋白有了认识。

共有 5 个极早期（IE）蛋白的编码基因：IE_{110}、UL_{54} 和 IE_{175} 分别编码 IE 转录调节子 IE_{110}、IE_{63} 和 IE_{175}，US_1 和 US_{12} 分别编码 IE 蛋白 IE_{68} 和 IE_{12}。IE_{68} 是一种磷酸化蛋白，含有较多的极性氨基酸。

在 UL 上，有 7 个基因产物为 HSV DNA 复制所需，其中有 DNA 聚合酶（UL_{30}）、主要的 DNA 结合蛋白（UL_{29}）和另一种 DNA 结合蛋白（UL_{42}）。对于其他 4 种与 DNA 复制有关的基因产物（UL_5、UL_8、UL_9 和 UL_{52}）的功能则知之不多，但 UL_5 基因产物的氨基酸序列上有 1 个 ATP 结合位点，故推测其具有利用 ATP 酶功能。还有一些基因编码蛋白参与 DNA 合成或核苷酸代谢，这些基因包括脱氧核糖核酸酶（DNA 酶，UL_{12}）、胸苷激酶（TK，UL_{23}）、核糖核酸还原酶的大小亚单位（UL_{39} 和 UL_{40}）及脱氧三磷酸尿苷酶（dUTP 酶，UL_{50}）。UL_{26} 基因编码的病毒体蛋白参与子代 DNA 的合成与包装。

HSV－1 的病毒体具有复杂的结构，约含有 30 种不同的蛋白。UL 和 US 上均有基因编码病毒体蛋白，其中有主要的衣壳蛋白（UL_{19}），可在新感染细胞中激活 IE 基因转录的主要的皮层蛋白（UL_{48}）和皮层磷酸化蛋白（US_9）。有 7 个基因编码 HSV－1 糖蛋白，即 gH（UL_{22}）、gB（UL_{27}）、gC（UL_{44}、gG（US_4）、gD（US_6）、gI（US_7）和 gE（US_8）。这些糖蛋白的 N 末端均含有疏水性的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

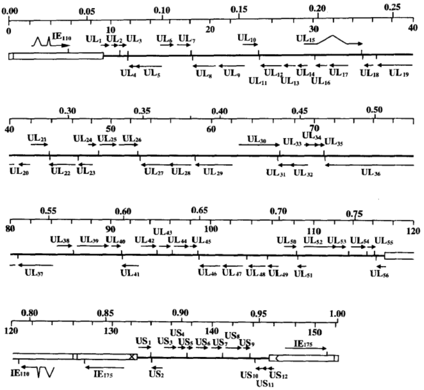


图 4-4　HSV-1 基因组上的基因排列

粗实线示单序列；空筐示重复序列；细实线示基因组的长度，线上方数字为图单位，线下方数字为从左到右排列的千碱基对(bp)数目；基因的开放阅读框(ORF)的长度与起止方向用横线与箭头表示，横线与箭头上方的字母和数字为基因的名称

标志序列，而在 C 末端则含有跨膜结构域。糖蛋白横跨感染细胞膜(或病毒囊膜)时，C 末端的亲水序列与胞浆接触(或在病毒囊膜的内侧)，靠近 C 末端的疏水性结构横跨脂质双层膜，而含有寡聚糖的较大的 N 末端疏水性结构域则暴露在细胞膜外(或病毒囊膜外)。HSV-1 糖蛋白在病毒的致病机制和诱导机体的抗病毒免疫应答中起重要作用。

还有一些基因产物可能是膜蛋白。UL_{10}、UL_{20}、UL_{43} 和 UL_{53} 的编码蛋白均含有类似糖蛋白的跨膜结构域。其中，UL_{53} 编码蛋白与 gB(UL_{27})一样，可引起融合性空斑现象，因此，几乎可以肯定 UL_{53} 基因产物是膜蛋白。另外，UL_{11} 编码一种肉豆蔻酸体的病毒体蛋白，分子量在 13 000 ~ 16 000 kDa 之间。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

表 4-7　HSV-1 基因定位及其编码蛋白特性

基　因	转录子 起　点	转录子 终　点	编码的蛋白质 氨基酸残基数	编码的蛋白质 分子量	编码的蛋白质 功能或特性
IE_{110}	2263	2319(外显子 1)	(19)		
	3085	3751(外显子 2)	(222)		
	3888	5489(外显子 3)	(534)		
			共 775	78452	IE 转录调节子
U_L	9215				
UL_1	9339	10011	224	24932	疏水性 N 末端
UL_2	9886	10888	334	26326	-
UL_3	10959	11664	235	25607	疏水性 N 末端
UL_4	12424	11827 左向	199		-
UL_5	15133	12487 左向	882	98710	DNA 复制:ATP 利用?
UL_6	15132	12487	676	74087	病毒体蛋白
UL_7	17137	18025	296	33057	-
UL_8	20478	18228 左向	750	79921	DNA 复制
UL_9	23261	20708 左向	851	94246	DNA 复制
UL_{10}	23206	24625	473	51389	泛疏水性
UL_{11}	25093	24805 左向	96	10486	病毒体蛋白
UL_{12}	26889	25001 左向	626	67503	脱氧核糖核酸酶
UL_{13}	28504	26950 左向	518	57193	-
UL_{14}	28905	28260 左向	215	23454	-
UL_{15}	29020	30048(外显子 1)	(343)		
	33635	34811(外显子 2)	(392)		
			共 735	80918	-
UL_{16}	31295	30716 左向	373	40440	-
UL_{17}	33497	31398 左向	703	74577	-
UL_{18}	36051	35097 左向	318	34268	-
UL_{19}	40528	36406 左向	1374	149075	主要的衣壳蛋白
UL_{20}	41488	40822 左向	222	24229	泛疏水性
UL_{21}	42074	43679	535	57638	
UL_{22}	46382	43868 左向	838	90361	病毒体糖蛋白 gH
UL_{23}	47802	46674 左向	376	40918	胸苷激酶(TK)
UL_{24}	47737	48544	269	29474	-
UL_{25}	48813	50553	580	62466	衣壳蛋白
UL_{26}	50809	52714	635	62466	病毒体糖蛋白
UL_{27}	55794	53082 左向	904	100287	病毒体糖蛋白
UL_{28}	58159	55804 左向	785	85573	-
UL_{29}	62053	58465 左向	1196	128342	DNA 复制:主要的 DNA 结合蛋白

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

基因	转录子 起点	转录子 终点	编码的蛋白质 氨基酸残基数	分子量	功能或特性
ori_L（开放阅读框 L）中央 62475/62476					
UL_{30}	62807	66512	1235	136413	DNA 复制聚合酶
UL_{31}	67379	66461 左向	306	33951	免疫细胞溶解抗性变异区
UL_{32}	69162	67374 左向	596	63946	
UL_{33}	69161	69551	130	14436	病毒体蛋白：疏水性 C 末端
UL_{34}	69633	70458	275	29788	
UL_{35}	70566	70902	112	12095	病毒体蛋白
UL_{36}	80543	71051 左向	3164	335841	
UL_{37}	84084	80715 左向	1123	120549	病毒体蛋白
UL_{38}	84531	85926	465	50260	核糖核苷酸还原酶的大亚单位
UL_{39}	86444	89855	1137	124043	
UL_{40}	89926	90946	340	38017	核糖核苷酸还原酶的小亚单位
UL_{41}	92637	91170 左向	489	54914	引起宿主自身活动停止的病毒体蛋白
UL_{42}	93113	94577	434	51156	DNA 复制：DNA 结合蛋白
UL_{43}	94748	96050	511	44905	泛疏水性
UL_{44}	96311	97844	172	54995	病毒体糖蛋白 gC
UL_{45}	98032	98548	718	18187	疏水性 N 末端
UL_{46}	100952	98798 左向	693	78239	
UL_{47}	103116	101037 左向	490	73812	
UL_{48}	105079	103609 左向	301	54342	主要的皮层蛋白：IE 基因的活化子
UL_{49}	106391	105488 左向	371	32252	
UL_{50}	107010	108123	244	39125	脱氧尿嘧啶三磷酸酶
UL_{51}	109011	108279 左向	1058	25468	
UL_{52}	109048	112222	338	114416	DNA 复制
UL_{53}	112179	113193	512	37570	泛疏水性
UL_{54}	113734	115270	186	55249	IE 转录调节子（IE_{63}）
UL_{55}	115496	116054	197	20491	
UL_{56}	116923	116332 左向		21182	
IR_L 起点	117158				

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

续表

基因	转录子		编码的蛋白质		
	起点	终点	氨基酸残基数	分子量	功能或特性
IE_{110}	122483	120882 左向(外显子 3)			
	123286	122620 左向(外显子 2)			
	124108	124052 左向(外显子 1)			
a' 序列的左端					
C 插入序列的起点 126373					
IE_{175}	131128	133904 左向	1298	132835	IE 转录调节子(IE_{175})
ori_S(开放阅读框 S)中央 131999					
US 起点	132065				
US_1	132644	133094	420	46521	IE 蛋白(IE_{68})
US_2	134928	134055 左向	291	32468	-
US_3	135222	136665	481	82381	蛋白激酶
US_4	13674	137458	238	25236	病毒体糖蛋白(gG)
US_5	137731	138007	92	9555	假定存在的糖蛋白
US_6	138419	139601	394	43344	病毒体糖蛋白 gD
US_7	139785	140955	390	41366	病毒体糖蛋白 gI
US_8	141243	142893	550	59090	病毒体糖蛋白 gE
US_9	143321	143582	90	10026	皮层磷酸化蛋白
US_{10}	145094	144158 左向	321	34053	病毒体蛋白
US_{11}	145245	144762 左向	161	17756	-
US_{12}	145576	145321 左向	88	9792	IE 蛋白(IE12)
TR_S 起点	145584				
Ori_e(开放阅读框 e)中央 146234					
IE_{175}	147104	150998			

* 开始部位:(1)"左向"指该基因的转录方向从右至左,未标明"左向"的基因转录方向均为从左至右;(2)分子量指根据氨基酸组成推算的分子量

(二)HSV－1、VZV 和 EBV 基因组的比较

VZV(水痘－带状疱疹病毒)与 HSV 同属 α 疱疹病毒亚科,而 EBV(EB 病毒)则属于 γ 疱疹病毒亚科。VZV 基因组共含有 124 884 个核苷酸残基。VZV DNA 分子中 UL、RS 和 US 的长度与 HSV－1 相似,但其 RL 只含有 88 bp。VZV 基因组的 G＋C 含量为 46.0 mol%,与 HSV－1 基因组的 G＋C 含量 68.3 mol%相比可知,VZV 的核苷酸组成与 HSV－1 有很大不同。VZV 的 S 片段比 HSV－1 少 6 个基因,即缺乏与 US_2、US_4、US_5、US_6、US_{11} 和 US_{12} 相对应的基因。在 UL,VZV 与 HSV－1 的许多基因是互相对应的,但二者之间仍有许多差别。例如,VZV 的 No.57 基因在 HSV－1 无相应基因,后者此位置上是 UL_3。又如,VZV 的 No.32 基因也不能在 HSV－1 上找到相应基因,后者此位置被 UL_{27} 占据。另一方面,VZV 缺乏与 HSV－1 UL_{56} 和 UL_{45} 相对应的基因,但却具有 HSV－1 所没有的胸腺嘧啶合成编码基因(N_{13})。另外,VZV 的 No.61 基因位于 UL,为单一拷贝;HSV－1 相应的 IE_{110} 基因却位于 RL,并有两个序列相同但方向相反的拷贝。

EBV 的基因组含 172 282 个核苷酸残基,其序列与 HSV－1 和 VZV 有重大差异。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

如能弄清各种人类疱疹病毒的 DNA 序列并进行比较，定会有助于了解各种病毒的致病机制和进化关系，并进一步找到防治疱疹性疾病产生的途径。

HSV－1 的基因组很大，研究 HSV－1 基因组的资料亦很多。尽管 HSV－1 基因组的全序列已经弄清，但仍有许多人类认识空白点，需要各国病毒学家继续努力以揭示其秘密。

二、HSV 的复制

（一）吸附与穿入

HSV 包膜共有 8 种糖蛋白（gB、gC、gD、gE、gG、gH、gI、gJ），在吸附与穿入研究中证实，gB、gD 和 gH 是主要起作用的糖蛋白成分。利用合成肽或相应的糖蛋白可抑制 HSV 的吸附，应用针对 gB、gC、gD、gE 的单克隆抗体亦可抑制病毒的穿入。病毒包膜与宿主细胞膜融合后，HSV 可进入胞浆内。HSV 也可通过被胞饮而进入宿主细胞。有学者认为经胞饮进入细胞的 HSV 以非生产性感染告终，病毒不能复制出有感染性的病毒子代。穿入后，核衣壳经核孔被转移至细胞内。gB 和 gC 是 HSV 吸附时识别受体的组成成分；而 gB 和 gD 则是在 HSV 包膜与细胞膜融合时所必需的成分。HSV 被膜中的一种蛋白成分（称为 VP16）通过反式激活作用，可活化 HSV 的 α 基因。因此，除病毒 DNA 外，HSV 的一些其他成分对病毒 DNA 进入细胞核内及释放至核内亦有重要作用。

（二）病毒基因的表达

在病毒的复制期间，细胞内约有 50 多种病毒的基因产物，这些产物的合成是有秩序地按一定序列连锁反应方式进行的。基因产物中有些是酶，有的是 DNA 的结合蛋白，均与病毒 DNA 复制相关。为了便于理解基因产物有条不紊的调节作用，可将多肽分为 3 组，即 α、β、γ 组多肽。复制的基本过程有 3 步：第一步是 RNA 转录出 α 多肽（共有 5 种多肽），约在感染后 2～4 h 合成，经传递后进入细胞核。在病毒感染的后期仍不断表达 α 多肽，但其表达速度不如早期有规律。绝大多数 α 多肽有调节功能。第二步是 β 多肽的表达。β 多肽的表达有赖于 α 多肽的存在。β 多肽在感染后 5～7 h 合成，分别为 β_1 组、β_2 组多肽。β_2 组多肽包括 TK、DNA 多聚酶和 DNA 结合蛋白。一旦出现 β 基因的产物，即标志病毒 DNA 已开始合成。第三步为 γ 多肽的合成。γ 基因可被归类为 γ_1 及 γ_2 基因。γ_1 基因编码糖蛋白 gB 与 gD，在感染较早期表达，受 DNA 合成抑制物的影响较小；γ_2 基因仅在感染晚期表达，编码 HSV 包膜糖蛋白，在有一定浓度的 DNA 合成抑制物存在时则不表达。HSV 的基因不用立即早期、早期与晚期基因这些名称，而用 α、β、γ 的主要原因是因为有 β_1、β_2 基因及 γ_1、γ_2 基因，这些基因的表达条件不完全相同。

（三）病毒 DNA 的复制、装配与释放

HSV 与其他 DNA 病毒复制的不同点在于该病毒 DNA 合成需要许多酶参与。用放射性核素标记追踪及超速离心法研究发现，复制的病毒 DNA 没有游离末端，呈环状或首尾相接的连环体。实验结果提示，至少在感染晚期，HSV 的 DNA 是以滚环式进行复制的。利用基因部分缺陷的 HSV DNA 做转染，或与辅助病毒共感染的实验，发现 HSV－1 及 HSV－2 均各有 3 个 DNA 复制起始点。2 个复制起始点位于 α_4、α_{22} 的启动子间（$OriS_1$）及 α_4 与 α_{47} 启动子间（$OriS_2$）；第三个复制起始点在 β 基因中编码主要的 DNA 结合蛋白（ICP_8）的启动子与 DNA 多聚酶之间（OriL）。$OriS_1$ 或 $OriS_2$ 的 DNA 合成是非对称性的，而 OriL 则可进行双向复制。用缺失突变证

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

明，如 HSV 缺少 OriL 或一个 OriS，病毒仍能复制。病毒有几个复制起始点提示，病毒存在的局部环境可增强更改其起始转录。

病毒复制过程中需要许多蛋白参与，该蛋白可分为两大类：一类蛋白与启动复制病毒 DNA 有关；另一类蛋白则是核苷酸代谢所需的酶（如 TK、核苷酸还原酶、dUTP 酶等）。近来，通过组建带有 HSV DNA 合成起始点 DNA，及分别与 HSV 不同基因片段连接的质粒，用之转染细胞，观察 HSV DNA 的复制。发现 L 段中有 7 个开放读码框架是病毒复制所需要的成分：UL_5、UL_8、UL_9、UL_{29}、UL_{30}、UL_{42} 和 UL_{52}。UL_{30} 编码 DNA 多聚酶，UL_{29} 编码与单链特异 DNA 结合的蛋白称为 ICP_8，UL_9 编码与 DNA 复制起始点结合的蛋白。UL_5、UL_8 和 UL_{52} 编码的 3 种蛋白结合组建成复合物，具有螺旋酶的功能。此外，还发现 UL_5 能单独编码依赖 DNA 的 ATP 酶，其中以 DNA 多聚酶及 ICP_8 研究得最多。这 7 种蛋白是以 Ori 为起始点进行病毒 DNA 复制所必需的成分。

此外，HSV 还有 TK，可使脱氨嘌呤或嘧啶被磷酸化。因 TK 作用的底物不被细胞的激酶所磷酸化，故可选择性使用核苷类药物治疗 HSV 感染。在编码 TK 的基因部位突变后，病毒则不能或极少产生 TK。HSV 的核糖核苷还原酶是由 1 个大分子的亚单位与 1 个小分子亚单位组成，可使核糖核苷还原为脱氧核糖核苷，作为合成 DNA 的底物。当 HSV 在培养于 37℃的细胞中复制时，不需要该酶；但当细胞停止分裂时，HSV 必需此酶方可复制，说明在活跃的分裂细胞中，该酶的功能可由其他组分代替。

HSV DNA 复制后须经加工方可包装入病毒的衣壳。包装过程为 α 基因序列增多及病毒 DNA 断裂成有游离末端的形式。至于为何出现倒置的 L、S 片段尚不了解。病毒编码的糖蛋白在细胞膜上形成斑块区后，HSV 的 DNA 外包上衣壳而形成的核衣壳，则向有病毒糖蛋白区的胞膜移动，经芽生形式自感染细胞表面释放完整病毒。这些胞膜表面的糖蛋白带有病毒的决定簇，易被机体的细胞免疫应答所识别。

（四）病毒基因表达的调控

HSV 基因表达受到一系列调控因子所影响。HSV 的 DNA 由细胞的 RNA 多聚酶Ⅱ所转录。某些 HSV 的基因可有数个转录起始点；偶尔，转录终止点可越过 poly(A)尾而至其下游。不同 HSV－1 基因的 mRNA 量及其稳定性亦不同，如 α、β 基因的 mRNA。ICP_4 与 TK 基因的几处功能区可结合并进行调控。病毒的结构蛋白 αTIF（存在于包膜及核壳体间的间层区）在感染细胞内被释放，进入胞核后可激活 α 基因。ICP_4 还可自我调控，即这一蛋白可与其编码基因的起始位点附近结合，从而关闭 ICP_4 基因的表达。

由于病毒基因的调控研究可为真核细胞基因的调控研究所借鉴，故上述基因表达的调控是近年研究的热点。

三、HSV 蛋白质

HSV 能合成 50 种以上的病毒特异性多肽，其中 30 余种最终用于病毒结构蛋白，以聚丙烯酰胺凝胶电泳分析受染细胞的提取物，可将多肽显示出来。病毒蛋白合成于细胞浆内，但多数被运入细胞核，供装配病毒核衣壳使用。

（一）糖蛋白

感染 HSV 后，感染细胞表面和病毒体的包膜上产生一些糖蛋白。已鉴定由病毒编码的至

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

少有 8 种特异性糖蛋白。已知至少有 4 种糖蛋白(gA/B、gC、gD 和 gE)在血清型间具有相同的免疫交叉反应。用 ts 突变株 HSV－1(HFEM)和 ts B_5 株的重组株研究发现:gB 对病毒穿入细胞起着重要作用,可能是促进病毒包膜和宿主胞浆之间的融合;糖蛋白 gC 在调节病毒诱生膜的融合中可能起某种作用;gE 对免疫球蛋白的 Fc 片段有亲和力,它具有 Fc 受体的功能。gI 的功能尚不了解。各种糖蛋白的作用见表 4－8。

表 4－8 HSV 糖蛋白的功能

功　能	gB	gC	gD	gE	gG	gH	gI
为细胞培养中复制所必需	+					+	
吸　附	+	+	+	+			
穿　入	+	+					
细胞融合	+	+	+			+	
自细胞内排出						+	
Fc 受体	－	－	－	+	－	－	+
C_{3b} 受体	－	gC－1	－	－	－	－	
自然杀伤细胞作用的部位	+	+					
中和作用	+	+	+	+	+	+	
细胞介导免疫	+	+	+	+			

gB 是感染细胞中含量最多的糖蛋白,近年来,已成功地将 gB 基因(HSV－1 及 HSV－2)在细胞中表达。应用 HSV－1 的 gB 蛋白免疫小鼠,动物可产生高效价的抗体,并对该病毒的攻击表现为保护力。自 HSV－1 中直接提取的 gB 的免疫保护效果较重组 gB 为强,前者可 100% 保护小鼠,后者有 80% 保护作用,而对照小鼠则 80% 死亡。目前已获得编码 HSV－1 及 HSV－2 的 gB 基因序列,发现这两种病毒的 gB 糖蛋白同源性可高达 86%。两种 gB 的不同氨基酸位于糖蛋白自 N 端的 85 个氨基酸和中心部位第 451～495 个氨基酸。有学者认为这两个部分可能是两种蛋白质分子反应的不同部位。

(二)结构蛋白

HSV 的衣壳蛋白由多种肽组成。根据衣壳蛋白中是否有 HSV DNA 被分为 A 型(无 DNA,从不被包膜所包被)、B 型(有 HSV DNA,但亦不被包膜所包被)及 C 型(有 HSV DNA,被包膜包被,并可能带有被膜成分)。被膜蛋白以 αTIF(又名 ICF_{25},VP_{16})最重要,可以反式激活 α 基因。如 VP_{16} 缺失突变,HSV 不能生存。其他还有病毒抑制宿主细胞生物合成蛋白(virion host shut off,VHS 蛋白)及 VP_1,二者均是一种大分子量蛋白,可与病毒基因组 α 序列结合。

(三)病毒蛋白的免疫原性

HSV 蛋白的免疫原性可用以下方法进行鉴定:①通过常规免疫法或杂交瘤技术产生对个别蛋白的特异性抗体;②通过分析实验动物或人急性期及恢复期血清中的抗体全部组分,有生物学意义的抗原是糖蛋白抗原。

常规免疫法产生的抗体主要是针对 gB、gC、gD 和 gE。gD 产生的抗体中和性最强。个别糖

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

蛋白的抗体对动物有保护作用，在受病毒攻击时可免于死亡。HSV－1 gH 的抗体中和效价较低。这些抗体可以区别 HSV－1 和 HSV－2 个别糖蛋白的免疫特异性。病毒的糖蛋白都有一组独特的抗原决定簇，但 HSV－1 蛋白抗体与 HSV－2 相应的糖白有交叉免疫性，反之亦然。经免疫印迹及免疫细胞杀伤试验，显示两者都有中和及免疫沉淀作用。利用杂交瘤技术已获得多种 HSV－1 和 HSV－2 蛋白的单克隆抗体，这些单克隆抗体是将病毒蛋白分成型特异和型相同的重要工具，这对于研究发展免疫预防是重要的。

分析 HSV 或其感染细胞超免疫血清中的抗体全部组分，表明大多数 HSV 蛋白在活动性感染时都是免疫原。用免疫沉淀和免疫印迹法研究人血清中的抗体，发现 HSV 糖蛋白抗体在血清中占优势。也有学者观察到非糖基化蛋白的抗体也大量存在于人血清中。在人血清中的抗体亚类变化很大。

HSV 糖蛋白具有刺激 T 细胞增殖的能力。当感染细胞膜上出现抗原，则可被 T 细胞杀伤。根据免疫细胞毒性试验观察，在体外用感染性病毒或经紫外线灭活的病毒刺激小鼠或人形成 Tc 细胞，这些活化的特异性淋巴细胞靶分子是糖蛋白。应用衣霉素抑制糖基合成后，感染 HSV 的靶细胞对 T 细胞杀伤的易感性显著降低。

四、HSV 的潜伏感染

HSV 最有意义的特性是病毒可以潜伏存在，即以非活化的状态存在于机体内，时间可长可短。潜伏状态的 HSV 经适当的激活因子作用后，又可被活化。作为一种生物学现象，自 1905 年起就已被描述，但其机制始终未被揭示。动物实验证明，HSV 在口腔或生殖道粘膜构成原发感染灶后，病毒由感觉神经传递到感觉神经节，并在其中复制数天。一旦病毒完成复制过程，即以潜伏状态存在。抗病毒药物对潜伏状态的 HSV 无效，因潜伏的 HSV 并不复制，故对作用于病毒 DNA 合成的药物不敏感。潜伏的病毒曾自三叉、骶部、迷走神经节中重新被分离出来。当上述神经节与人胚肺细胞在体外共同培养时，新生长的细胞可出现细胞病变。但病毒复制必须在将细胞进一步传代后方能显示出来。有学者对 90 具尸体的三叉神经节做上述培养，结果从 44 具尸体中分离到 HSV，其中 26 具尸体的双侧三叉神经节中均分离到 HSV。对 68 份骶部神经节用同样的方法分离 HSV，9 份样品为阳性，其中 8 份为 HSV－2，仅 1 份为 HSV－1。已有 HSV 潜伏的神经节是否可重复感染通过对 HSV 做限制性内切酶图谱分析可揭示。不同地区分离的 HSV 的 DNA 酶切图谱不同，故可用作流行病学追踪。母亲与新生儿或单一性伴侣间所分离的 HSV 的 DNA 酶切图谱完全相同。对多性伴侣病人的 HSV 的 DNA 酶切图谱分析，发现可以有相同或不同的病毒株，从而证实已有 1 株 HSV 潜伏的神经节还可再次被感染。

在潜伏期，HSV 的基因组以环状附加体（episome）浓集成类似染色体的形式存在。这种形式的 HSV 基因具有有限的、典型的基因表达模式：只有在 UL 侧翼的反向重复序列中的一些基因区才可被转录。1987 年 Stevens 发现，与 α 基因互补的多形性 mRNA，可大量积聚在潜伏感染 HSV 的人或动物的神经节中。这些转录体被称为潜伏相关转录体（latency associated transcript，LATs）。LATs 与 ICP0 区重叠，但由另一条 DNA 链所转录。LATs 因有不同的剪切点，故长短不一，主要存在于神经细胞核内，3′末端无 poly(A)尾。最多见的 LATs 长度约为 2.0 kb，其他还有 1.5 kb、1.45 kb 长的 LATs。通过组建不同的重组体并用报告基因（reporter gene）分析，发现在 2 kb LATs 上游约 700 bp 处有启动子－1（latency－active promoter－1，LAP－1），在 2 kb LATs 5′邻近区有 LAP－2，且有富含 G＋C 区，但无 TATA box。认为可能这一区是 HSV 潜伏时可以开启

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

LATs 部位。当 HSV 潜伏时，HSV DNA 可被细胞的核小体所结合，从而通过 LAP 启动 LATs。另一方面，也有学者通过基因缺失突变，获得 LAT 基因阴性的病毒株，感染小鼠或家兔后，用共同细胞培养法来检查 HSV 的潜伏情况，结果发现该病毒仍可潜伏。因此，LAT 是否直接与 HSV 潜伏相关，尚在研究中。

另一侧面的研究是对病毒基因拷贝数的比较。观察潜伏有 HSV 的三叉神经节，发现每个细胞约有 0.1～1 个 HSV 基因组。如以带有 HSV 的神经元占全部神经元的 0.1%～3% 估算，则每一带病毒基因组的细胞内将有非常高拷贝数的病毒。据推测，同一神经元可受数个病毒组入侵并潜伏，或者在潜伏状态，病毒的基因组受细胞成分所调控而得以大量扩增。

在小鼠实验中发现，用 TK^- 和 αO^- 缺失突变株感染小鼠后，不能自感染的神经节中激活 HSV。也有学者证明，用缺失 TK 的突变株可在家兔中建立潜伏感染。因此，对于 TK 及 αO 基因是否与 HSV 潜伏感染有关，尚有争论。Roizman 提出了建立与维持潜伏感染的模式：①可能有两种不同的机制阻断 HSV 在神经元中的表达。当病毒 DNA 与反式激活因子 αTIF 不同时存在时，HSV 的一些基因表达及病毒复制被阻断，但这不是唯一因子，还可有另一种机制阻断 HSV 的表达。②激发潜伏的 HSV 基因组使之进入复制周期，可能是多种刺激因子积累的结果。可能是局部激活因子与全身性激活因子协同作用，致病毒的 DNA 拷贝数增多，当病毒的拷贝数超过一定阈界时病毒可被激活。不同细胞的激活阈值可不同，不是所有细胞均同时同步地被激活，而致 HSV 转入复制型。③增多的病毒拷贝数是否导致复发性感染，将取决于病毒株是否具有复制所必需的全部基因，以及这些基因表达的产物是否充分。如未能达到复制所必需的条件，则病毒将以潜伏形式长期存在。

五、治疗 HSV 感染的分子生物学基础

HSV 的潜伏感染难以用药物治疗，但对存在病毒复制的复发性感染，则可针对病毒复制的不同阶段进行治疗。对于生殖道 HSV－2 感染及疱疹性脑炎、疱疹性角膜炎，及时进行抗病毒治疗是重要的措施。药物中无环鸟苷及阿糖腺苷作用的分子基础是说明抗病毒治疗的很好例证。

（一）阿糖腺苷

阿糖腺苷（Vira－A）是一种嘌呤类核苷。阿糖腺苷对病毒 DNA 合成的抑制作用比对宿主细胞 DNA 的抑制作用强，其较低浓度时即可抑制 HSV DNA 复制，而不抑制细胞的 DNA 合成。通过宿主细胞激酶的作用，Vira－A 可以被磷酸化为有活性的 Vira－ATP。因其不需 HSV TK 的作用，故当 HSV 对无环鸟苷耐药（出现 TK^- 缺乏突变株）时，该药品仍可起作用。阿糖腺苷可通过：选择性抑制 HSV 的 DNA 多聚酶，抑制 HSV 诱生的核糖核酸还原酶，掺入病毒 DNA 致其 DNA 链合成终止等环节发生作用。由于发现对阿糖腺苷耐药的 HSV 株，其病毒 DNA 多聚酶发生变异（变异主要发生在 pol 基因的 0.8 kb 基因区），故可以确定 DNA 多聚酶是 HSV 被抑制的主要环节。阿糖腺苷对于局部抗 HSV 感染很有效，用于及时治疗 HSV 引起的角膜炎，可避免病情进一步恶化而导致的角膜严重病变。对于严重的 HSV 全身性感染的婴儿，本药品可将死亡率从 74% 降低至 38%。在 HSV 脑炎中，静脉注射阿糖腺苷，可使死亡率从 70% 下降至 28%。神经系统的 HSV 感染，可以通过从脑脊液中检出 HSV 抗体，或用 PCR 检出 HSV 基因片段进行快速诊断，从而及时用药。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（二）阿昔洛韦

阿昔洛韦（无环鸟苷）是鸟嘌呤的衍生物。在第 9 位氮原子上有一无环侧链。该药物是专用于抗 HSV 的制剂。因无环鸟苷必须经 HSV 编码的 TK 激活后，磷酸化为一磷酸－无环鸟苷，以后再经细胞激酶磷酸化成为二、三磷酸化无环鸟苷。三磷酸化无环鸟苷对病毒 DNA 多聚酶的亲和力远高于对细胞 DNA 多聚酶的亲和力，从而表现为对细胞的毒性较低。无环鸟苷－ATP 对 dGTP 有极强的竞争性，故可以终止病毒 DNA 链的合成。无环鸟苷主要用于生殖系统的 HSV 感染，可使局部排病毒时间缩短（由 7 d 降低为 4.1 d），并可使局部病灶提早愈合（从 10.5 d 降为 7.1 d）。口服该药或静脉注射均可采用，后一途径给药，在原发感染病人中效果更为显著。

（三）BVdU

BVdU [5－(2－bromovinyl)－2－deoxyuridine]是一种胸腺嘧啶核苷的衍生物，对于抗 HSV－1 较 HSV－2 感染更为有效，因 BVdU 对 HSV－1 TK 的亲和力较 HSV－2 TK 为高。BVdU 也需经病毒的 TK 活化，磷酸化为 TP－BVdU，才具有抗 HSV 作用，因此其 TK 变异病毒株对此药物不敏感。

（四）其他

由于近来发现了 LATs 在导致 HSV 感染中的作用，如利用反义寡核苷酸技术，将有可能发展对潜伏型 HSV 的新治疗途径。此外，由于 HSV 的核衣壳在细胞核膜上先获得一些糖基化蛋白质，以后才移行至细胞表面并获得病毒编码的糖蛋白突起，如能设计糖基化的抑制物，也将是抗病毒作用的又一靶环节。

第四节　人类乳头瘤病毒的分子生物学

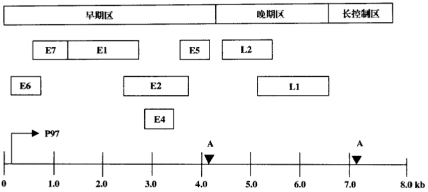
Shope 在 1933 年观察到棉尾兔乳头瘤病毒的感染可引起角化病损，其中一部分可发展成为浸润性上皮肿瘤，从而发现了第一个可引起哺乳动物发生肿瘤的 DNA 病毒。乳头瘤病毒具有高度宿主特异性，并可以感染几乎所有脊椎动物粘膜或皮肤的上皮。其感染可引起良性病变（初期）、自限性疣或上皮肿瘤。深入的研究发现，一些特殊的人类乳头瘤病毒（HPV）亚型与宫颈、外阴、阴茎、结膜、上呼吸道及上消化道的恶性及恶变前病损有关。全世界 10% 的癌症与 HPV 感染有关，其中大部分为肛门、生殖器癌。约 80% 的宫颈肿瘤中可检测到 HPV 的 DNA。在美国，估计有 55 000 名妇女会被诊断为宫颈肿瘤，将导致约 4 600 人死亡。人们对 HPV 在非生殖器部位癌症中的病因学作用知之甚少。

一、HPV 基因组组成

人类乳头瘤病毒是最小的 DNA 病毒，其直径约 55 nm，无被膜，为 20 面体，病毒颗粒含有一环状双链共价闭合的约 8 000 bp 的 DNA。其 DNA 与细胞组蛋白结合，外被以蛋白衣壳。病毒基因组由三个长度不同的主要片段组成。10% 的病毒基因组为长控制区（LCR），其作用为调节病毒基因的表达。基因组的其他部分由早期（E）和晚期（L）基因构成，分别占基因组的 50% 和 40%（图 4－5）。所有病毒基因均由 DNA 的一条链编码。L_1 和 L_2 基因编码主要衣壳蛋白（55 kDa）和次要衣壳蛋白（70 kDa）。这些蛋白仅在终末分化的鳞状上皮细胞中表达。E 基因编码非结构蛋白，其作用是调控病毒的转录和复制，表达于非增殖感染的细胞和转化的细

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

胞。依 HPV 亚型不同，E_4、E_5、E_7 基因通常编码单条多肽链，而 E_1、E_2、E_6 基因可通过不同拼接表达数种相关的聚合蛋白。



病毒蛋白	功能
E1	病毒 DNA 合成
E2	转录调节蛋白
E4	分解细胞角质，晚期蛋白
E5	与生长因子受体相互作用
E6	转化蛋白，结合并始动 p53 降解；转录激活因子，激活端粒酶
E7	主要转化蛋白，结合视网膜母细胞瘤基因家族成员（Rb_1，p107，p130），周期素 A
L1	主壳蛋白
L2	次壳蛋白

图 4－5　乳头瘤病毒基因组图谱

人类乳头瘤病毒基因是双链环状约 8 000 bp 的分子。箭头代表早期(E)和晚期(L)基因转录起始处。也列出了各乳头瘤病毒开放阅读框架(ORF's)相应的功能

HPV E_1 基因编码分子量为 68 kDa 和 27 kDa 的多肽。68 kDa 蛋白具有 ATP 酶和螺旋酶活力，并可与 LCR 中特殊序列结合以启动 DNA 的复制。HPV E_2 基因可表达一种或多种蛋白。其长度在 370～430 个氨基酸之间，具有转录活性及 DNA 结合功能区。E_2 蛋白通过对转录的激活或抑制来调节病毒的转录和基因组的复制。E_4 开放阅读框架(ORF，可翻译为蛋白的序列)表达于病毒复制的晚期，并参与乳头瘤病毒颗粒的成熟和释放。E_5 基因编码小的高度保守的 44～80 个氨基酸的多肽。牛乳头瘤病毒 E_5 基因具有编码癌蛋白的作用，可以通过抑制细胞表面的细胞生长因子受体的正常降解，而使某些啮齿动物细胞株发生转化；HPV E_5 基因在细胞转化和人类癌症中的作用仍不清楚。HPV E_5 基因可以转化体外培养的 NIH3T3 细胞，并可以与表皮生长因子受体、血小板源性生长因子 β 受体、克隆刺激因子 1 受体和 p185neu 复合。HPV－16 E_5 可以诱导鼠表皮角化细胞转化。然而，因为 E_5 在大多数 HPV 阳性癌中不表达，其在人类癌症中的确切作用仍未知。

HPV E_6 和 E_7 癌基因分别表达约 151 和 98 个氨基酸的蛋白。剪切的 E_6 多肽可由某些 HPV 亚型癌基因经过不同拼接而表达，但其在疾病进展中的作用仍不清楚。有关 HPV E_6 和

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

E_7 编码的癌蛋白的特性已有深入的综述。E_6 蛋白定位于核基质和其他非核膜结构中，并可与 E_7 共同作用使人类早期角质细胞永生化。HPV－16 E_6 编码的癌蛋白具有锌结合区，并能与宿主细胞 p53 肿瘤抑制蛋白结合，从而引起 p53 降解。因为 p53 具有调节细胞生长和肿瘤抑制功能，p53 功能的丧失将会导致细胞周期紊乱，有利于突变、染色体不稳定及宿主基因组癌变的发生。E_6 编码的蛋白还可激活端粒酶。该酶是一种可合成端粒重复序列的核苷酸复合物，对细胞永生化具有重要作用。

HPV E_7 基因编码小的核蛋白，该蛋白可诱导静止细胞的 DNA 合成，并能与已激活的癌基因 ras 或 fos 协同作用，转化早期啮齿动物细胞。E_7 编码的蛋白可与视网膜母细胞瘤基因家族（Rb_1、p107、p130）蛋白形成复合物。该基因家族表达的蛋白具有负性调节细胞生长的作用。Rb_1 通过与转录因子如 E_2F 结合并破坏其功能。E_2F 可调控在 DNA 合成中起作用的细胞基因的表达。Rb_1 可被一种或多种周期素依赖性蛋白激酶磷酸化。Rb 的非磷酸化状态被认为具有阻抑细胞周期进程的作用。其他 Rb 相关蛋白如 p130 或 p107 可调控细胞周期中不同的限制点，并可与周期素 A 和 E 结合。HPV－16 E_7 可与非磷酸化的 Rb_1 结合，在细胞中释放游离的转录因子 E_2F，从而激活参与细胞周期进程调控的数种宿主基因的表达。E_7 也可与 Rb 相关的 p130 和 p107 蛋白结合，这些细胞基因调控细胞周期中从 G_0 期到 G_1 期，G_1 期到 S 期的过渡和 G_2 到 M 期的进程。

基因的研究已证实，E_7 中完整的、对 Rb 有高度亲和力的结合部位，对啮齿动物和人类细胞的转化是至关重要的。除了 E_6 可以灭活 p53 以外，E_7 也可同参与细胞周期进程调控的其他基因（b－myb 和周期素 A）相互作用并（或）破坏其表达，从而使细胞逃避正常的限制点，造成 DNA 复制失真。

二、HPV 种系与癌

由于不能稳定地获得 HPV 的血清制剂，其分型是基于病毒基因组中的核酸同源程度。目前，E_6、E_7 和 L_1 的核苷酸序列必须与所有已记载的基因型相差在 10%以上。迄今，人们已证实了 70 多种 HPV 亚型，并根据其种系发生的不同而分为 3 个超群（A、B 和 E）。HPV 基因亚型 16、18、31、33、35 及 45 在种系分支中多属 A 超群。A 超群还包括一组与寻常疣关系密切的 HPV 亚型，和与生殖器病损及喉乳头状瘤相关的 HPV－6 和 HPV－11 在内的另一组成员。B 超群包括大部分与上皮疣状异常增生相关的 HPV 亚型。近来人们在免疫抑制患者的鳞状细胞癌中发现了一些新的 B 超群的 HPV 基因组。

人们对 HPV－5，6，8，11，16，18 和 46 的基因内的变异进行了研究。基因序列的变异在编码区达到 2%，在非编码区为 5%。从总体上讲，乳头瘤病毒基因组的进化速度估计约为每 100 000 年变异 1%，明显低于 RNA 病毒的进化速度。这些发现使某些研究者认为所有已知的 HPV 亚型是非常稳定的，从人类诞生以来几乎一直以相同的组成存在。

目前分离出的 70 多种 HPV 亚型中，只有少数可以在生殖器的高度异常增生组织及浸润癌中稳定检测到，从而引出了高危和低危 HPV 感染的概念。高危癌基因病毒包括 HPV－16，18，31，33 和 35。HPV－39，45，51，52，56，57，58，59 和 61 在其他肛门生殖器部位的异常增生和恶性病损中偶有发现。HPV－16 在宫颈鳞状细胞癌中最常见，而 HPV－18 主要见于宫颈腺癌。这两种高危 HPV 亚型的组织分布特异性的分子机制仍不清楚。低危 HPV 包括HPV－6，

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

11,13,32,34,40,42,44,53,54,55 和 63,它们常与良性病损如宫颈湿疣有关。高危和低危 HPV 在功能上的差别与感染细胞的恶性转化关系密切。高危 HPV 可诱使细胞染色体畸变和非整倍体的增多,并且编码癌蛋白(E_6、E_7),这些癌蛋白可特异地与参与细胞生长和增殖调控的细胞蛋白(p53、Rb)相互作用。高危、低危 HPV 主要反映在对宫颈肿瘤的研究中,因此,在其他恶性组织中出现相对较少的其他 HPV 亚型,也可能具有高危 HPV 亚型的某些特性。

在对高危与低危 HPV 亚型序列对比中,一致发现第 21 个残基有单个氨基酸的差别(如 HPV - 16 E 蛋白第 21 位为天冬氨酸,而低危的 HPV - 6 E_7 相应处为甘氨酸),因此,给定 HPV 亚型基因的变异水平,低危 HPV E_7 蛋白单个氨基酸的替代,可稳定地促使其出现高危 HPV E_7 癌蛋白的特性。

三、正常口腔组织中的 HPV

HPV 在正常组织中的阳性率基线,有助于人们对该病毒 DNA 在各种口腔病损中的分子和流行病学意义进行评价。然而,收集健康口腔细胞以检测 HPV DNA 的方法还未标准化,而且其阳性率的估计仍不一致。Lawton 等比较了 3 种检测正常口腔组织 HPV DNA 的标本的收集方法:3%蔗糖冲洗,用消毒勺在 3 个不同部位的粘膜刮擦,和足够厚度的颊粘膜活检。所有参加者(N=60)均进行了 3 种方法的取样。蔗糖口腔冲洗法所得的总 DNA(平均 15.5 μg,范围为 1.0~149.8 μg),较刮擦法(平均 3.1 μg,范围为 0~74.3 μg)和活检法(平均 8.0 μg,范围为 0.8~74.3 μg)多。3 个方法中,活检法通过 PCR 所测得的 HPV 阳性例数最少(11.9% ,刮擦法 45.5%,口腔冲洗法 51%)。60 个参加者中,PCR 检测到 36 例(占 60%)HPV 阳性,每个阳性标本有至少一种 HPV 亚型(6,11,16,18,31,33)。

Oswald 等(1994)发现,来自于 97 名参加者的口腔刮擦标本,每个可得到约 1.2×10^6 个细胞。使用 PCR 检测这些健康人标本,HPV 的感染率为 1%。相反,Jalal 等(1992)进行了健康志愿者的口腔 HPV 筛选实验,其标本通过刮擦取自于颊粘膜、硬腭以及舌背。在没有临床疾病的人当中,且看似正常的口腔上皮中,总的 HPV - 16 的阳性率为 43%(13/30)。Maitland 等从没有口腔及宫颈乳头瘤病毒感染史的个体中,获得了正常人类颊粘膜的全层上皮活检组织。通过采用 PCR 结合高和低严格条件下的杂交技术,他们发现 42%(5/12)的组织是具有变异的 HPV - 16 的 HPV 阳性。作者将刷取或漱口方法的结果差异归因于取样中的上皮基底细胞层,该层可有潜伏 HPV 感染的 DNA 片段的存在。

研究者欲为了估计口腔正常组织的亚临床性、潜伏性及复制性 HPV 感染的流行情况,使用不同的取样方法,以及不同的检测 HPV DNA 的实验室方法,得到各种不同的结果。通过活检取得的组织标本大小局限,这容易错失局限性的 HPV 感染。然而,活检可以获得基底层,该层可能存在潜伏的和亚临床的感染。口腔粘膜刮擦或口腔冲洗可以得到大量的口腔粘膜表层脱落细胞,但只能得到复制性感染的 HPV DNA。

四、HPV 的传播方式

肛门生殖器的 HPV - 16 感染的传播一直被认为与性接触有关,宫颈 HPV 感染率在 15 岁到 40 岁之间的年龄段增加,尤其是那些有多种性接触的人。头颈部 HPV 感染的传播方式还不完全清楚。然而,有理论提示有通过口 - 生殖器接触、围产期传播,以及通过手—口—生殖器接触的自我感染的性传播可能。这也提示了口腔可能是 HPV 感染的传染库。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

Maden 等在一个对男性进行的有病例对照的研究中，调查了性行为、HPV 和口腔癌的关系。仅在 6 例患者和 1 例对照者的脱落口腔细胞中发现了 HPV－16。没有发现口腔癌、口腔性接触和 HPV－16 感染之间的病因学联系。虽然在这个特定研究中 HPV－16 感染是口腔癌的一个危险因素，但是没有 HPV－16 性传播证据的报道。

一些研究者检测到了新生儿分娩过程中的 HPV 围产期传播，甚至来自无 HPV 相关病损的临床表现的母亲。此外，复发的呼吸系统乳头瘤病也与 HPV 的围产期传播有关 新生儿 1.0%～47.8% 鼻咽部提取物有 HPV DNA，其结果变化大可能是因为分娩过程中羊水标本采集受限和实验方法的不同。一些在新生儿中测得的 HPV DNA 类型与其母亲产前和产后的检测结果不完全一致。例如，Smith 等(1991)的研究中，一个妇女的宫颈脱落细胞标本为 HPV－16、18 DNA，而其新生儿的口咽标本为 HPV－31、33、35 DNA。提示 HPV 的传播具有多种途径。

Kellokoski 等进行了 3 个研究，以了解生殖系统的 HPV 感染是否可使妇女更易于有口腔 HPV 感染。第一个研究是对 334 名有生殖系统 HPV 感染的妇女的前瞻性随访研究。检测了 60 例口腔病损和 195 例正常组织的活检标本有无 HPV 感染。这些受试者 90% 以上无口腔粘膜 HPV 感染的临床、组织学和细胞学改变。两个后继研究比较了不同的试验方法，以明确生殖器和口腔粘膜 HPV DNA 亚型的流行情况。选择了 309 例生殖系统 HPV 感染的妇女，对其口腔粘膜刮擦物的 DNA 进行斑点杂交检测，只 3% 有 HPV－6 DNA，1.1% 有提示为 HPV－11 或 16 的 HPV DNA。虽然参与研究的妇女中 50% 以上与其性伙伴有口腔性接触，但仅有 3 例妇女口腔和生殖系统标本有相同的 HPV DNA 亚型。她们的性伙伴并未参与研究。在第三个研究中，Kellokoski 等使用 Southern 杂交方法，发现 15% 的口腔粘膜标本有 HPV DNA，而使用 PCR 则有 29.4% 有 HPV DNA。只有 2 例病人其生殖系统粘膜与口腔粘膜有相同的 HPV 亚型(1 例为 HPV－11，1 例为 HPV－16)。从这些结果看来，口腔 HPV 感染并不普遍，而且生殖器 HPV 感染似乎并不使个体易于有口腔 HPV 感染。然而，这些解释是在假设急性 HPV 感染不能被免疫监视机制清除，而且 HPV 片段作为核酸残余物保留于细胞中的前提下。

五、HPV 致癌作用的分子机制

人类肿瘤的发生发展开始于分子水平并包含了多个步骤。尽管 HPV 可能是发生宫颈肿瘤最重要的危险因素，但 HPV DNA 的存在并不足以启动恶性进程，其他基因的改变在恶变进程中也可能是必需的。HPV DNA 的整合在宫颈恶性病损中较常见，从而导致 E_2 基因的失活和 E_6、E_7 转录物水平的升高。E_6 和 E_7 基因在 HPV 相关的宫颈癌中几乎都有表达。从机制上讲，HPV 癌蛋白不仅可致 pRB、p53 的肿瘤抑制功能失活，而且可激活丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶周期素依赖性激酶(CDK)复合物，该复合物可控制真核细胞的分裂。通过破坏限制点的控制使细胞周期的运行不需要基因的完整性，从而允许肿瘤细胞中的变异和染色体改变的积累。这些结果提示了高危 HPV 亚型可作为单个诱变因素，经过一定的时间而成为细胞转化和肿瘤发展的先决条件。

HPV 感染可使人类生殖器的早期角质细胞及口腔和扁桃体上皮细胞永生化。因为永生化细胞株在组织培养中延长传代后会发生表型改变，所以上述结果提示 HPV 作为恶变的始动因子具有重要作用。有效的永生化需要 E_6 和 E_7 的表达，而 E_7 编码转化过程中重要的决定物。高危 HPV 亚型编码的 E_6 和 E_7 蛋白对 Rb 相关蛋白(Rb_1、p107)和 p53 的结合力比低危 HPV 亚型高出 10 倍，提示高危 HPV 可以屏蔽 p53 和 Rb 相关蛋白，从而防止这些基因在致癌

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

过程中出现突变性的失活。与之相一致，在 HPV 阳性的宫颈癌细胞株中很少检测到 p53 和 Rb 的变异。而某些侵袭性更强的宫颈癌的研究中检测到 p53 的变异。

除了 HPV E_6 和 E_7 基因外，一些其他基因的改变可促使 HPV 介导肿瘤。HPV LCR 和 E_1、E_2 基因的改变可通过影响 E_6 和 E_7 的表达来影响细胞转化。HPV E_2 基因在这个过程中显得最为重要，因为其表达产物可下调 E_6 和 E_7 mRNA 转录物的水平。由于 HPV 的整合破坏了 E_1/E_2 的开放阅读框架，E_2 的丢失导致 E_6 和 E_7 转录物表达增高，从而引起 p53 和 Rb 相关蛋白的失活。约 75%的宫颈癌标本中检测到 HPV－16 DNA 的整合形式，重度异常增生和原位癌中 DNA 的整合则较少。

（陈谦明　L.P. Samaranayake　赵　蔓）

参考文献

1 Macrina FL, Dertzbaugh MT and Halula MC, *et al*. Genetic Approaches to the Study of Oral Microflora: a Review. Cri Rev Oral Bio Med, 1990;1(3):207

2 Michalek SM and Childers NK. Development and Outlook for a Caries Vaccine. Cri Rev Oral Bio Med, 1990;1(1):37

3 Kuramitsu HK. Virulence factors of Mutans Streptococcus. Role of Molecular Genetics. Cri Rev Oral Bio Med, 1993;4(2): 159

4 Greenstein G & Lamster I. Bacterial Transmission in Periodontal Diseases: a Critical Review. J Periodontol 1997;68: 421

5 Jin YT, Lee WY, Su IJ. Presence of Human Herpesvirus－like DNA sequence in Oral Kaposi's Sarcoma: a Preliminary PCR study. Oral Surg, 1996;81: 442

6 Lycke E. Biological and Molecular Aspects on Herpes Simplex Virus Latency. Scand J Infect Dis, 1990;69(s):113

7 Suclly C, Samaranayake LP. Clinical Virology in Oral Medicine and Detistry, 1 ed, Cambridge University Press 1992

8 Samaranayake LP. Essential Microbiology for Dentistry. 1 ed, Churchill Livingstone, 1996

9 Mckaig RG, Baric RS, Olshan AF. Human Papillomavirus and Head and Neck Cancer: Epidemiology and Molecular Biology. Head & Neck, 1998;20:250

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第五章 人类口腔癌的分子生物学

第一节 概 述

新近的调查结果表明，每年美国有 40 000 人、其他国家有 350 000 人患有口腔肿瘤。在普通人群中，口腔癌在最常见的癌症中居于第六位，在发展中国家居于第三位。约半数的患者将在诊断后 5 年内死亡，而大多数存活的患者将具有美学及功能的缺陷。国际疾病分类定义口腔癌为口腔和咽部的癌，包括唇癌、舌癌、唾液腺癌、龈癌、口底癌，以及口腔内其他区域如口咽、鼻咽、咽下、咽和其他颊部区域的恶性肿瘤。癌占了口腔恶性肿瘤的 96%，其中有 91% 是鳞状细胞癌。尽管在过去的 20 年中癌肿总体死亡率有所降低，但口腔癌的 5 年存活率仍是最低的之一，远远低于其他许多肿瘤，包括皮肤恶性黑色素瘤、睾丸癌、乳腺癌、结肠癌、直肠癌和肾癌。1983 ~ 1989 年美国国立癌症协会的流行病学报道，只有 33% 的黑人和 54% 的白人患者在检测出口腔癌以后存活了 5 年以上的时间。

显然，为进一步提高口腔癌患者的存活率，需要深入了解口腔癌的病因学及其发展过程。烟草和酒精仍然是口腔鳞癌最重要的危险因素。病毒，如人类乳头瘤病毒很早就和口腔癌的形成联系在一起。但是，大部分暴露于这些危险因素中的人群没有发生口腔癌，并且口腔肿瘤也散发于年轻人和烟草、酒精的非应用者中。基于这些事实，提出了遗传易感性的概念（详见本章第八节）。近来，由这些危险因素导致的染色体改变进而产生的许多遗传学变化逐步被认识，并成为口腔鳞状细胞癌组织病理学研究进展的基础。总之，应用分子生物学技术于口腔癌的早期检测和（或）治疗，对较大地降低其死亡率和发生率都具有重要作用。本章着重介绍分子肿瘤学的一些基本概念以及目前人类口腔癌的分子生物学研究状态。

在细胞水平上，肿瘤是一种遗传性疾病。其证据包括：①具有遗传性 DNA 修复缺陷的人群中患癌的危险度增高；②导致 DNA 突变的理化因素也能引起动物癌的发生；③生殖细胞的一些结构性染色体重组使其易于发生癌；④肿瘤细胞 DNA 的获得性突变与家族性肿瘤中所见相似；⑤通过与癌基因有关的基因转移研究可将恶性表型带给正常细胞；⑥通过基因处理能在转基因小鼠体内诱导恶性表型。

多年来，肿瘤的发生被假设为多阶段过程。直到重组 DNA 技术的应用，才真正地识别了与癌的引发、促进和进展有关的分子水平的（DNA）变化，并使应用分子医学深入了解癌的发病机制成为可能。目前我们所具有的在 DNA 水平上确定突变的能力，已经提高了一些疾病诊断的精确性，并正指导着治疗方法的选择。

由于分子肿瘤学的术语较多，在此简单地加以介绍。癌基因（oncogenes，onkos - 希腊语表示肿块或肿瘤）是指这些基因突变或表达混乱之后，能够引起与肿瘤相关的增殖。原癌基因（proto - oncogenes）是癌基因在正常细胞的基因组中的对应部分，它们在控制正常细胞的生长中发挥着重要的生理作用。病毒癌基因（v - oncogene）和细胞癌基因（c - oncogene）是在逆转录病毒或细胞对应部分中发现的癌基因。肿瘤抑制基因（tumor suppressor genes），又称隐性癌

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

基因,抗癌基因或生长抑制基因)也是在正常细胞增殖和分化中发挥作用的基因。肿瘤抑制基因的缺失和失活能导致肿瘤的发生。转化（transformation）是指正常细胞获得肿瘤的表型。转染（transfection）是指 DNA 片段渗入真核细胞这一基因转移的过程。转导（transduction）是指基因通过病毒感染在细胞间的传输。

第二节　口腔癌与癌基因

一、逆转录病毒与病毒癌基因

逆转录病毒即 RNA 肿瘤病毒,是发现的第一个遗传因素与肿瘤形成有关的证据。逆转录病毒含有 3 个核心基因,其中 env 和 gag 编码结构蛋白,pol 编码逆转录酶。逆转录酶可使 RNA 逆转录成互补 DNA。通过这种方式,逆转录病毒能以其 RNA 为模板形成 DNA 拷贝并进入宿主的基因组。

其他基因的参与使逆转录病毒具备了在体内诱导肿瘤生长,在体外使细胞转化的能力。在后一种情形下,细胞失去正常的生长特征并获得肿瘤表型。例如,细胞失去接触抑制以致于在体外不是以单细胞层生长,而是不受调节地增生为细胞团块。逆转录病毒中编码蛋白质的 DNA 序列被称为病毒癌基因。其名称源于它们第一次被发现的肿瘤,例如,v－sis(simian sarcoma virus,猴肉瘤病毒);v－abl(murine Abelson leukaemia virus,鼠 Abelson 白血病病毒);v－mos(Moloney sarcoma virus,Moloney 肉瘤病毒);v－ras（rat sarcoma virus,鼠肉瘤病毒)。

在病毒癌基因之后发现的具有细胞正常对应物的癌基因称为细胞癌基因。原癌基因被用来描述在其自然状态下不具有使细胞转化的癌基因。现已知原癌基因在细胞生长控制中起关键作用。

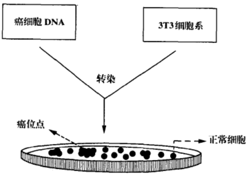


图 5－1　基因转移确定原癌基因

早在 1910 年,研究者就对病毒与癌的关系进行了最初的观察。Rous 证明有一种可渗透成分(病毒)能诱导鸡产生癌。1956 年,Rous 因此被授予诺贝尔奖。从此,逆转录病毒被认为是多种群(包括哺乳动物)中的致癌原因。但是,直到基因转移和识别影响 DNA 和染色体突变研究方法的出现,逆转录病毒与人类癌的直接联系才被阐明。

基因转移的最终结果是来源于恶性肿瘤的 DNA 被转染或转移入细胞株(图 5－1)。在正常情况下,细胞株以融合的单层方式生长,且每个细胞与其邻近细胞保持不连续状态。转化癌基因的存在,使细胞能成簇生长。这些细胞获得肿瘤表型的又一证据,是将它们接种入免疫缺陷的裸鼠内而获得的。正常细胞不能在这种情形下生长,而转化的细胞将产生肿瘤。

从肿瘤细胞中提取 DNA,将其转染入易感细胞株,如 NIH 3T3 鼠成纤维细胞株。转染通过

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

DNA 与磷酸钙共沉淀来诱导。另外的可替代并且有效的方法包括电穿孔，即将细胞暴露于强电区域，使高分子量 DNA 分子渗透入细胞。基因转移研究使新的癌基因及其相关作用的研究成为可能。癌基因可在肿瘤病灶中分离的 DNA 中克隆出来。

基因转移研究证明了癌基因与人类癌症如膀胱癌、结肠癌、肺癌以及其他多种癌症的关系。通过这种方式已发现新的癌基因。这种方法首先在人膀胱细胞株 T_{24} 中获得成功。分离出的癌基因是 H－ras。在体内基因转移的对等物是转基因鼠。转基因模型可通过将癌基因连接到具有组织特异性的启动子上产生。在这种情形下，如将 ras、myc 转基因，经过一段长的潜伏期后，即可有肿瘤的发生。

二、原癌基因

原癌基因是与细胞生长控制有关的基因，原癌基因有多种，在细胞生长控制中的作用也很复杂，并且可能涉及许多原癌基因间的相互作用。根据其作用位点及方式，原癌基因可分为：①生长因子；②生长因子受体；③蛋白激酶；④信号转导物；⑤核蛋白和转录因子（表 5－1，图 5－2）。

表 5－1　部分原癌基因及其作用方式

分　类	举例	在细胞中的作用
生长因子	sis	PDGF（血小板源性生长因子）的 B 链
生长因子受体	erbB	表皮生长因子受体
	fms	CSF－1 受体（集落刺激因子）
蛋白激酶	abl，src	酪氨酸蛋白激酶
	mos，raf	丝氨酸蛋白激酶
信号转导	H－，K－，	GTP－ 结合/ GTP 酶
（G 蛋白）	N－ras	（鸟苷二磷酸结合蛋白）
核蛋白	myc，N－myc	DNA 结合蛋白
	myb，fos	DNA 结合蛋白
	Jun	转录因子

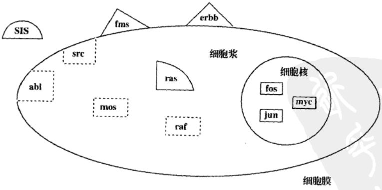


图 5－2　原癌基因的细胞定位

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（一）生长因子

生长因子是通过细胞表面受体诱导细胞分化而起作用的一类分子。正常情况下细胞内的生长因子并不发挥作用，生长因子在细胞内表达，就是癌基因激活的证据。

（二）生长因子受体

一些来源于原癌基因的蛋白构成细胞表面生长因子受体的组成成分。生长因子与其各自的膜受体结合，是有丝分裂信号传递给细胞内部使细胞分化的第一步。这些原癌基因的结构性变化能使肿瘤开始形成。

（三）蛋白激酶

原癌基因的蛋白产物与胞浆膜或细胞膜的内表面有关。这些基因的结构性变化可增高蛋白激酶活性，随之将影响膜受体或信号转导。

（四）信号转导

细胞外的生长因子一旦与其细胞表面受体结合，它就能将其信号通过一系列步骤传导到核，其中一些步骤涉及第二信使。GTP（三磷酸鸟苷）和结合 GTP 的蛋白（G 蛋白）在细胞内信号转导中起着重要作用。在 G 蛋白 GTP 酶活性的作用下，GTP 转换为 GDP（二磷酸鸟苷）。

Ras 原癌基因（即 H－ras－1，K－ras－2，N－ras）组成了一个多基因家族，它存在于从酵母到人的真核生物中。这种进化的保守性显示 ras 基因具有重要的功能性意义。ras 原癌基因编码的相关蛋白分子量为 21 kDa，称为 p21。来源于 ras 原癌基因的蛋白具有 GTP 酶的活性，以及与 GDP 和 GTP 结合的活性，即是说，它们与 G 蛋白有关。ras 原癌基因的生理功能之一，是通过将信号从细胞表面传递到核来调节细胞增殖。野生型 ras p21 蛋白与 GTP 连接，GTP 转换为 GDP，该蛋白即失活。

（五）核蛋白和转录因子

研究显示，有越来越多的原癌基因编码核结合蛋白。其中包括一些以前被描述为在基因表达控制中起重要作用的转录因子。

三、癌基因的激活

原癌基因的正常产物能被扰乱，导致细胞分化的失控，并由此形成肿瘤，这当中的许多机制都已通过分子研究而得到明确。其激活方式主要有：染色体转位、基因扩增、点突变和病毒的插入（表 5－2）。

表 5－2　原癌基因和肿瘤发生的 DNA 变化

原癌基因	DNA 异常	人肿瘤
abl	转位	慢性粒细胞性白血病
myc	转位	Burkitt 淋巴瘤
erb B	扩增	鳞状细胞癌，星状细胞瘤，食管癌
N－myc	扩增	神经母细胞瘤，小细胞性肺癌
K－ras	点突变	结肠癌，肺癌，胰腺癌，黑色素瘤
N－ras	点突变	急性髓细胞样和淋巴母细胞性白血病，甲状腺癌，黑色素瘤
H－ras	点突变	泌尿生殖道癌，甲状腺癌

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

(一)染色体转位

人基因组内癌基因的位置改变可改变其功能。其中一种方式是通过转位,例如,某染色体上的一个片段移动到另一染色体上。在慢性粒细胞性白血病中,产生 Philadelphia 染色体的染色体断裂点,涉及到 9 号染色体上的 c-abl 原癌基因转位到 22 号染色体上的一个基因,22 号染色体被称为断裂点簇区(bcr)。同时,22 号染色体上的 sis 原癌基因转位到 9 号染色体上。融合基因 bcr-abl 转录产生一种新的蛋白(p210),具有酪氨酸激酶活性。表达 bcr-abl 融合基因的转基因鼠产生淋巴母细胞性白血病/淋巴瘤。

(二)基因扩增

基因数量的定量可通过 DNA 图谱分析。在人类许多癌症中都可发现扩增的 c-myc 序列。在儿童神经母细胞瘤中,N-myc 基因可被扩增到 300 倍。

(三)点突变

在不同 ras 基因中观察到,原癌基因的 DNA 序列的单个碱基变化是一致的。很多恶性肿瘤均证明有 ras 突变。尽管已知 ras 突变位点局限于密码子 12、13 和 61,这些密码子位于编码 GTP/GDP 的结合物的区域内,但这些突变如何产生效应仍未知。推测,ras 转化活性复合物(GTP-ras)到非活性复合物(GDP-ras)的失败将引起激活作用的过量,从而导致细胞增殖失控。

(四)病毒插入

破坏原癌基因功能的另一种方式是通过插入病毒成分。例子之一是乙型肝炎病毒。

四、口腔癌与癌基因

尽管癌基因单独不足以使正常口腔角质细胞转化为恶性,但它们似乎是这一过程的重要引发物。在经历多种"癌前"遗传性改变的细胞上,已进行了由单个原癌基因的突变诱发口腔上皮细胞恶性转化的研究。这些生长促进因子的表达改变了口腔角质细胞内的单个信号传导通路,从而使这些细胞获得恶性表型。

口腔肿瘤的引发和进展可能与原癌基因突变并异常表达有关。与口腔癌的发生有关的癌基因主要有:原癌基因上皮生长因子受体(EGFR)/c-erb 1,ras 基因家族成员,c-myc、cint-2、hst-1、PRAD-1 和 bcl-1 的非正常表达也被认为对口腔癌的发展起了很大的作用。已报道在 DMBA 诱导的金黄地鼠颊囊恶性口腔癌模型中,有细胞癌基因 c-erb B1 的过表达和扩增。也有作者发现转化生长因子 α(TGF-α)在人类口腔癌和金黄地鼠口腔肿瘤中的表达异常,并认为 TGF-α 促进了新的血管化和有丝分裂。

(一)生长因子

生长因子能刺激口腔角质细胞增殖。在口腔癌的发生中,生长因子通过增高的产量和自分泌刺激而下调。TGF-α 在口腔癌发生的早期,在过度增生的上皮中过表达;以后,在浸润炎性细胞中,尤其是围绕于口腔上皮周围的侵袭性嗜伊红粒细胞上过表达。早在 1975 年,Healy 就注意到在口腔癌中嗜伊红粒细胞的增多(上升至整个炎性浸润细胞的 17%),并且这是口腔癌的一个恒定的病理学特征。TGF-α 是一个 50 个氨基酸的多肽,它促进口腔组织细胞及体内其他类型细胞的增殖。TGF-α 通过自分泌或旁分泌形式,与上皮生长因子受体(EGFR)结合来刺激靶细胞。另外,TGF-α 在上皮癌的发生中可能起有肿瘤促进作用。研究发现,头颈部癌症患者中,外观"正常"的口腔粘膜过度分泌 TGF-α 者易发生第二个肿瘤原发灶,提示存

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

在快速增殖的癌前状态和上皮遗传性的不稳定。与那些只有 EGFR 过表达的肿瘤相比,TGF-α 和 EGFR 共表达的肿瘤可能更具侵袭性。

(二)细胞表面生长因子受体

配体受体结合,激活了细胞内层叠的生化步骤。蛋白磷酸化的调节在细胞功能和基因表达中是一个重要环节。编码细胞表面受体的基因突变,可导致受体数量增高和组织的配体依赖性有丝分裂信号产生增多。

EGFR、EGF 和 TGF-α 的生物学受体,是一个 170 kDa 的磷酸糖蛋白,通常发现在人类口腔癌中过表达。恶性口腔角质细胞具有较其正常对应物多 5~50 倍的 EGFR。目前,对癌发生中 EGFR 基因激活的机制作出了 3 种假设:①在配体结合区域内 N 端的缺失或突变,例如发生于病毒癌基因 v-erb B 中的情况即是如此;②与 EGF 和(或)TGF-α 持续存在的同时发生 EGFR 基因的过表达;③受体 C 端的缺失,它防止在配体结合后受体的下调。大多数关于 EGF 和(或)TGF-α 的资料是以人神经胶质瘤的分子研究为基础。在人类口腔癌中类似的研究尚未展开。因此,确定人 EGFR 基因的突变范围,对更好地了解人口腔癌中这一常见的被活化的生物标志过表达的机制,具有重要意义。与具有低水平 EGFR 表达的肿瘤相比,过表达 EGFR 的口腔肿瘤对化疗表现出更好的反应,提示 EGFR 的过表达可能是由具有更高的内在的增殖活性引起,能使对药物治疗的敏感性提高。这种药物疗法对处于有丝分裂阶段的细胞具有细胞毒性。

(三)细胞内信使

细胞内信使也能被激活,由此传递连续的信号不是配体调节的信号。在细胞内信号通路的所有成员中,只研究了 ras 基因家族成员(H-ras,K-ras,N-ras)在人口腔癌中的作用。Ras 癌基因首先在鼠科的 Harvey 和 Kirsten 肉瘤逆转录病毒中被识别。它们均编码相关蛋白 p21,位于细胞膜的胞质侧。Ras 蛋白具有与鸟嘌呤核苷酸(GDP 和 GTP)结合的特性,同时具有高度亲和性和特异性。

最近显示,在使受体与细胞内第二信使结合时,ras 蛋白与 G 蛋白具有相似性。Ras 蛋白通过与 GTP 结合传递有丝分裂信号。GTP 水解为 GDP 就终止了该信号。大约有 30% 的人类肿瘤有 ras 基因家族的成员突变。可是,突变的 ras 基因在人口腔癌发生中的作用至今仍不清楚。来自印度的报道证明,有 35% 的口腔鳞状细胞癌患者具有 H-ras 突变;来自西方的研究却显示头颈部癌症患者中有 H-ras 的突变的不到 5%。在口腔癌中,K-ras 已被显示由 1 个点突变而激活。K-ras 保持活化状态时,源于该突变的 1 个氨基酸发生变化以致不能水解 GTP,即不能将 GTP 转化为 GDP,由此连续刺激细胞增殖。在金黄地鼠口腔癌模型中,c-Ha-ras 和 c-erb B 癌基因呈持续性表达。在这种啮齿类动物的口腔癌模型中,H-ras 基因 61 密码子的突变被认为是早期事件。

(四)转录因子

转录因子,或调节其他基因表达的蛋白在口腔癌中也有改变。基因表达的调节是细胞内通路改变的一个重要结果。转录因子 c-myc,帮助调节细胞增殖和分化,通常在口腔癌中过表达。由 c-myc 基因的扩增引起的过表达总是与分化差的肿瘤和差的预后相联系。由 c-myc 刺激的基因表达及其在口腔癌发生中的重要性尚不清楚。另一个转录因子即细胞周期启动子 PRAD1 (或称 CCND1,或细胞周期素 D_1),是一种细胞周期启动子,在头颈部癌中也有扩增。细胞周期素 D_1 是 1 个细胞增殖的重要启动子,其对口腔癌发展的重要性正处于研究中。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

我们自己的研究资料显示，在口腔癌的发生中，从癌前期即可见细胞周期素 D_1 的扩增，并且与肿瘤的分化和转移相关。

目前已识别的癌蛋白在口腔癌发生中的作用正是研究的热点课题。除上述癌基因外，其他与口腔癌发展有关的癌基因尚有：hst－1，int－2，bcl－1，sea，men－1，ems－1。可是，仅有癌基因的激活还不足以引起口腔癌，癌基因只是该过程的引发因素。在癌前细胞向恶性细胞转化的过程中，关键的环节是细胞负性调节因子，即肿瘤抑制基因的失活。

第三节　口腔癌与肿瘤抑制基因

原癌基因和癌基因的识别，是分子生物学上癌的形成机制研究中令人兴奋的发展。可是，体外和体内实验的结果并不总是一致，并且只有 20% 的人类肿瘤被证明有这些基因的变化，同时，在遗传性癌症综合征中癌基因并非不正常。这样，需要寻找其他的分子方面的解释。

基因的扰乱可对细胞生长产生刺激或抑制信号。刺激效应的例子见以上所述的原癌基因。在这些情形下，突变是产生正性信号导致增殖失控的。另一方面，肿瘤的形成可通过肿瘤抑制基因的抑制功能的丧失而导致。该组基因在肿瘤形成中发挥作用的证据源于如下观察：①体细胞杂交体和新近通过“基因敲除”(knockout)产生的转基因鼠；②遗传性癌症综合征；③肿瘤的杂合性丢失。

一、实验性证据

(一)体细胞杂交体

在 60 年代后期，发现由正常细胞和肿瘤细胞融合形成的鼠细胞杂交体能恢复正常表型。接着，随着杂交克隆在培养中繁殖，肿瘤表型又重新建立。此效应可见于广泛的肿瘤细胞株中，并提示源于正常细胞的肿瘤抑制基因的作用。随后，在细胞株的连续传代中，可发生染色体丢失；当肿瘤抑制基因丢失时，肿瘤表型即会恢复。微细胞转移技术可使 1 个或几个染色体在重组膜内从正常细胞转至受体肿瘤细胞。用这种方法，能鉴定大量染色体上的肿瘤抑制基因。利用先进的分子技术如基因敲除使转基因鼠的特异基因失活，可明确证实有特别的基因作为肿瘤抑制因子发挥作用。

(二)遗传性癌综合征

视网膜母细胞瘤，遗传形式占病例的 40%，其余为散发病例。它是儿童最常见的眶内恶性肿瘤，发病率在存活的新生儿中为 1/14 000。在家族性病例中，有一半的孩子会受到影响，为常染色体显性遗传方式。在 70 年代早期，通过对视网膜母细胞瘤和 Wilms 肾母细胞瘤的流行病学研究，Knudson 提出了肿瘤形成的二次打击模式(图 5－3)。

Knudson 的模式认为，散发性和遗传性视网膜母细胞瘤的肿瘤细胞，在肿瘤发生以前获得两次独立的 DNA 遗传性变化。第一次引起易感性的变化可通过胚系遗传(家族性视网膜母细胞瘤)，或在体细胞中发生(散发性的视网膜母细胞瘤)。第二次变化发生于体细胞。对于散发性视网膜母细胞瘤来说，两次变化均发生于视网膜(体)细胞。对于家族性视网膜母细胞瘤来说，个体已经遗传了一个突变的基因，只需要在体细胞发生影响剩余的正常基因的第二次打击。体细胞突变的频率非常高，使遗传了胚系突变的个体均可能发生 1 个或多个肿瘤。

视网膜母细胞瘤的遗传方式是具有不完全外显率的显性遗传。但由于要改变 1 个细胞的

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

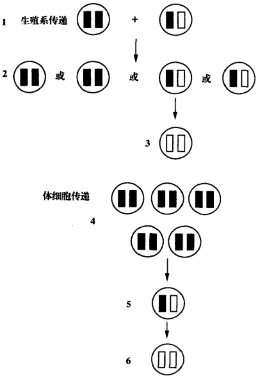


图 5－3　肿瘤在基因水平上的二次打击模失

第一次变化或引起易感性的变化是通过生殖细胞遗传获得，或在体细胞水平发生，第二次体细胞的变化需要失活另一个正常的等位基因座位。1.第一次变化发生于生殖细胞，特别野生型肿瘤抑制基因座位以■表示，第一次打击影响生殖细胞的其中一个抑癌基因座位，以□表示失活的抑癌基因座位；2.子代具有 50%的机会通过遗传得到突变型的抑癌基因（隐性遗传）；3.第二次打击使另一个正常的抑癌基因座位失活；4.散发性肿瘤的形成需要两次独立的发生于体细胞的变化；5.假如第一次打击影响体细胞，则将使此体细胞的一个抑癌基因座位失活；6.第二次打击作用于此易感细胞系，使另一个抑癌基因座位失活。体细胞突变方式较生殖细胞突变方式出现时间晚，而且表现为散发

表型需要 2 个等位基因的失活，所以在细胞水平它是隐性遗传。只有 1 个正常等位基因的细胞通常能产生足够的肿瘤抑制基因产物以保持正常。只有当此野生型等位基因的缺失才使其失控而增殖。不完全的外显率反映了第二次（体细胞）突变的必需性，并可解释肿瘤的发生跳过一些子代。另一方面，散发形式的肿瘤涉及两次分离的体细胞受打击事件。第二次打击必须发生在经历了第一次或引起易感性打击的同一细胞谱系。它的可能性相对较小，故肿瘤的散发形式发生的时间较晚，并具有另外的一些特征如单病灶和单侧发生。当视网膜母细胞瘤的 2 个等位基因最终被克隆和特征化，Knudson 提出的两次打击学说得到证实。

（三）杂合性丢失

在遗传性肿瘤，影响第二个（正常）等位基因，并因此而使之受到隐性突变的体细胞打击事件，包括染色体丢失或分子异常，如缺失、染色体遗传物质部分遗失。染色体重排、丢失或非整倍性（染色体数目异常），能通过研究组织细胞，如淋巴细胞和成纤维细胞，及将其与肿瘤细胞相比较，而在细胞遗传学上得到检测。可是，小的 DNA 缺失（微缺失）却难于发现。细胞遗传学分析并不能完全确定染色体的亲代来源。

DNA 多态性标志的判定，能区分正常或肿瘤细胞内的遗传成分是由哪个亲代所提供的（图 5－4）。DNA 标志是与包含肿瘤抑制基因的区域侧翼相连接，若此段丢失则可证实杂合性丢失。同样的方法也可用于散发性肿瘤的研究，这些散发性肿瘤可用受累个体的正常组织决定的基线或组织的基因型作为对照，同样的方法还可用于家谱分析，以确定遗传成分由亲代的哪一方所提供。这些研究结果可与肿瘤的 DNA 型比较。

检测肿瘤杂合性丢失的 DNA 研究已被用于识别假定的肿瘤抑制子区域，并已用于克隆和

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

特征化候选基因。17 号染色体 p 上的 p53 和 18q 上的 DCC(在结肠癌缺失)即是用这种方法筛选出来的两种肿瘤抑制基因。杂合性丢失在很多肿瘤中均已被描述(表 5-3)。从表中可清楚地看到,相同肿瘤抑制子区域与多种恶性肿瘤有关。

二、肿瘤的形成

肿瘤抑制基因在肿瘤形成中所起的各种作用目前尚在研究中。这些基因阻止癌症发展的可能途径包括:①阻止细胞增殖;②诱导细胞分化或死亡;③刺激 DNA 修复。

(一)细胞增殖

细胞周期是一个被调节的过程,即每个细胞能在细胞分裂以前完成 DNA 复制。细胞通过细胞周期对生长和外界信号作出反应。在分子水平,最近基于酵母和非洲蟾蜍属的研究观察,使我们更进一步地了解了细胞周期涉及的复杂步骤。在细胞周期中起刺激效应的关键成分包括细胞周期素和细胞周期素依赖性激酶。负性效应来源于对外来刺激作出反应的一系列检查点(checkpoint)。肿瘤抑制基因能通过干扰细胞周期的进程来降低肿瘤形成的能力,直到破坏的 DNA 得到修复。

该周期的控制依赖于许多相互作用的蛋白。刺激信号来源于细胞周期素(Cyclin),后者是一个蛋白家族,得名于它们的表达水平高低依赖于细胞周期。Cyclins D 和 E 作用于 G_1 期;Cyclin A 作用于 S 期, Cyclin B 作用于 G_2 期和 M 期。细胞周期素是细胞周期依赖性激酶的协同作用因子,细胞周期素依赖性激酶

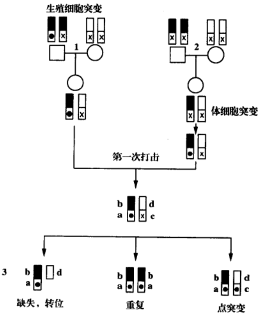


图 5-4 发生于肿瘤抑制基因第二个(正常)等位基因(体细胞)的分子缺陷

突变的肿瘤抑制基因以●表示,正常基因座位以 × 表示。1.第一个家庭,具有遗传性生殖细胞突变;2.第二个家庭,生殖细胞正常,但具有体细胞突变,两种情况的最终结果都是产生易感细胞,易感细胞中的两个等位基因座位的 DNA 标记以 b/a(突变)和 d/c(正常)表示;3.余留(正常)的肿瘤抑制基因通过第二次打击而发生分子缺陷,这种打击可以多种方式发生:缺失、不平衡性转位、重复,或更明显的异常如发生于第二个(正常)等位基因座位的点突变。假如有四个具有提示性的 DNA 标记位于肿瘤抑制基因座位,又能区分两个等位基因座位的上一代来源,即能够在 DNA 水平显示出杂合性的丢失。简言之,多态标记表示为 a(突变),b、c、d(正常)。杂合性丢失表现为 b/a,d(缺失,转位)及 b/a,b/a(重复),点突变时正常位点(c 标记)虽然出现,但因为突变的关系表现为无功能

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

(通常简称为 CDK)组成一个蛋白激酶家族(CDK_1 ~ CDK_6),它们使重要的靶蛋白磷酸化,与细胞周期调节有关。细胞周期的抑制性效应来源于肿瘤抑制基因如 p53、Rb_1 和另外一类称为细胞周期素依赖性激酶阻抑物的复合物。

(二)细胞分化和死亡

肿瘤抑制基因发挥作用的另一方式是通过诱导细胞分化而限制其增殖能力。通过这种方式,终末细胞的有丝分裂不如未分化细胞频繁。除了抑制肿瘤形成,肿瘤抑制基因在生物体发展的过程中还要发挥作用。最后,肿瘤抑制基因能诱导突变的细胞凋亡。

表 5-3 一些肿瘤中的杂合性丢失

肿 瘤	相关染色体
乳腺癌	1p,3p,11p,13q,16q,17p,17q
肺癌	3p,11p,13q,17p
直结肠癌	5q,17p,18q
多发性内分泌肿瘤	11q,1p,10q
脑肿瘤	9p,10p,10q,17p
食管癌	5q,13q,17p,18q
膀胱癌	11q,13q
肾癌	3p,14q,6q,8p
神经纤维瘤病Ⅰ型(Ⅱ型)	17q,(22q)
骨肉瘤	13q,17p
神经母细胞瘤	1p
黑色素瘤	1p,9p,17p
肝细胞癌	11p,13q,4p,5q,16q,17p
前列腺癌	7q,8p,9q,10p,10q,11p,13q,
	16q,17p,17q,18q,Y, 3p
头颈部肿瘤(包括口腔癌)	3p,5q,9p,11q,13q,17p,18q

(三)DNA 修复

现在已有一些初步的证据表明,肿瘤抑制基因对 DNA 修复机制具有直接的刺激作用。通过对肿瘤相关基因的典型代表 p53 的研究,证实了肿瘤抑制基因是通过不同方式影响癌症的发生。

三、口腔癌与肿瘤抑制基因

如上所述,肿瘤抑制基因(TSGs)或抗癌基因提供有效的负性调节控制,在肿瘤形成过程中这种作用因染色体改变而丧失。多种肿瘤抑制基因的功能性丧失被认为是导致恶性肿瘤发生的主要事件。癌基因通过 2 个基因拷贝中的 1 个突变来作用于细胞使其发生变化。与癌基因

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

不同,肿瘤抑制基因通常以“二次打击”的方式使 2 个基因拷贝发生点突变、缺失或重组而失活。因此,口腔角质细胞的恶性转化,即肿瘤抑制基因功能的丧失这一重要事件难于完成。这可部分解释成年人实体瘤如口腔癌的形成所需的时间较长。迄今为止,只发现 3 个基因——p53、doc-1 和凝血酶反应素 1 在恶性口腔角质细胞中表现出肿瘤抑制基因的活性。

(一)P53 基因

1. p53 基因的功能　p53 是最重要的肿瘤相关基因。该肿瘤抑制基因定位于 17 号染色体 p 臂 13.1 处,与遗传性和散发性癌均有关。该基因有 10 个功能性外显子,编码一段长 2.2~2.5 kb 的 mRNA。它在进化过程中的保守性提示了该基因的重要性。例如,鼠和人蛋白具有 80%的一致性。该基因表达于所有细胞,但在胸腺、脾、睾丸和卵巢中该 mRNA 水平最高。在大约 50%(包括口腔癌在内)的癌中发现有 p53 的突变。p53 作为肿瘤抑制基因发挥作用,它阻止用癌基因转化的细胞和动物形成肿瘤。通过基因敲除技术使 2 个 p53 等位基因均失活的转基因小鼠,在出生时是正常的,但到了 6~9 月龄,这些小鼠 100%会发生一系列的癌。肿瘤抑制基因的关键特征,即通过染色体的丢失或 DNA 重排,可见于染色体 17 p 上的 p53 位点。在分子流行病学背景下进行的 p53 基因研究,对我们了解癌的形成机制具有重要意义。

P53 蛋白含有 393 个氨基酸。该蛋白的 5 个片段在进化过程中具有高度的保守性,并且发现大多数 DNA 突变位于 4 个保守区中。通常 p53 基因的突变涉及单个碱基的变化。它们将干扰 p53 的转录活性,因为 DNA 结合被损害。这会间接影响受 p53 影响的其他基因。

受到 p53 基因突变影响的癌包括结肠、肺、脑、乳腺和卵巢癌,黑色素瘤,慢性骨髓样白血病及口腔癌。观察见到,75%~80%的病例系 2 个等位基因丢失,1 个通常为缺失,另 1 个为错义点突变。后者导致 1 个异常蛋白的产生。干扰 p53 基因的另一途径,是通过外源性病毒抗原或细胞癌基因与正常的 P53 蛋白结合。P53 通过 3 种机制,在抑制肿瘤的发展中发挥了关键作用:①细胞周期检查点的控制;②诱导细胞凋亡;③激活 DNA 修复机制。

(1)细胞周期:随着细胞受 DNA 破坏,如放射线或某种化学物质的作用,P53 蛋白水平会极大地增高。p53 编码的分子量为 53 kDa 的蛋白是一个转录因子,能在 DNA 水平调节许多基因。p53 在 G_1 期阻断细胞周期的进程。这就允许 DNA 修复发生在进入 S 期以前。p53 的细胞周期效应保证受损的 DNA 不进行复制,故称该基因为“基因组卫士”。

p53 突变型改变了生长调节蛋白,并能使正常(野生型)P53 蛋白失活。此种现象被称为“显阴性作用”,因为如果突变蛋白阻抑了剩余的正常等位基因的产物,1 个或 2 个肿瘤抑制因子位点的失活能产生显性的效应。

(2)细胞凋亡:细胞死亡可通过多种方式发生。坏死是其中一种形式,其特征是需要有一个外界偶然性因素如严重的损伤引发,这种方式与退化和炎性反应有关,邻近组织或细胞可被破坏,最终细胞残留物被吞噬细胞清除。与之相对,凋亡是一种发生于正常组织,在遗传性因素相互作用下的细胞自杀,并产生非炎症性的细胞死亡。在 DNA 水平,可见发生于 DNA 的核小体内的退化,这是因为细胞发生凋亡的早期,一些酶被激活,如核酸内切酶被激活,使 DNA 链在核小体的连接处被切断,产生若干大小不一的寡核苷酸片段。在琼脂糖凝胶电泳图谱上呈阶梯状区带形式迁移(由约 185 个碱基对的不同倍数构成)。凋亡又常被称为程序性细胞死亡,但一些研究者认为程序性细胞死亡不一定是细胞凋亡,因为在包括发育在内的许多生理过程的正常进程中,一些细胞经历有限的生活期,也可被认为是程序性的,但这些细胞的死亡不是通过凋亡。程序性死亡早期,无内切酶活化现象,因而无阶梯状 DNA 电泳图谱;编程性细胞

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

死亡有溶酶体的增加。但二者都不同于细胞坏死，即不伴有炎性反应和细胞崩溃及内容物的释放；都是有基因指导的细胞自发消亡，具有明确的生物学功能。但目前文献中两个名词常交叉使用，可视为同义词。

在分子水平，凋亡需要有许多基因的作用。了解得最清楚的是那些源于美丽铜四线虫（*nematode caenorhabditis elegans*）。就人类而言，研究者对两种基因按其对凋亡的效应进行了比较。Bcl－2 属于多基因家族，抑制凋亡，即它保护细胞不发生死亡。暴露激活的 Bcl－2 基因的淋巴细胞将发生染色体 14:18 转位，最终变为恶性，因为发生于这些细胞的自发性突变不能被遏制，反被聚集。p53 基因的作用相反，它能诱导受损的细胞发生凋亡，清除了肿瘤形成的潜在区域。尽管已知 p53 能刺激 bax 基因的合成，而 bax 基因能与 bcl－2 结合并阻断其作用，但 p53 诱导细胞凋亡的机制仍需进一步明确。

化疗剂损伤的细胞将刺激 p53 的产生，并由此而发生凋亡。该抗肿瘤效应可解释为什么具有野生型 p53 基因的癌症对治疗反应更好。另一方面，突变的基因不能通过这种方式起作用，并且化疗对癌细胞的损伤将在那些未被化疗剂直接杀死的细胞中积聚起来，这些细胞将接着形成一个新的、恶性程度更高的、对治疗具有抵抗性的肿瘤细胞克隆。p53 可成为一个有用的预后标志。

（3）DNA 修复：GADD45 是一个广泛存在于哺乳动物的基因。该基因由 DNA 损伤所诱导，也可被 p53 激活。其作用尚未完全明确，似乎对细胞周期起阻抑效应。有趣的是，它能刺激 DNA 切除修复。这样，在遗传毒理作用下，p53 的激活能激活 DNA 修复通路，而其中一条与 GADD45 相关。

2. *p53 基因与口腔癌*　现在不仅证明 p53 功能在口腔肿瘤中失活，而且发现，在口腔癌细胞株和动物模型诱导的口腔肿瘤中，p53 功能恢复将导致恶性表型回复正常，由此使口腔癌的发生逆转。

应该注意到，研究结果显示，p53 与人类乳头瘤病毒（HPV）的癌基因蛋白 E_6 相互作用，致 p53 蛋白通过泛肽介导的蛋白质水解系统迅速降解。类似的相互作用见于 HPV E_7 蛋白和 pRb 之间，该作用干扰 E_2F 转录因子家族的活性调节，该现象对受累细胞的增殖方式将产生复杂的后果。HPV 感染与颈部癌之间的联系既有流行病学证据，又有实验室证据，现在认为 HPV 是颈部癌的病因。口腔癌的发生也涉及相似的机制。

研究认为，吸烟与头颈部鳞状细胞癌（SCC）中的 p53 基因突变有关。通过免疫组织化学染色发现，重度吸烟患者的口腔肿瘤中有 p53 表达。这些作者提出 p53 基因的改变可能是口腔癌遗传性损害的靶位之一。近来已采用多聚酶链反应来显示烟草和头颈部鳞状细胞癌患者 p53 高频率突变之间的关系。81 个吸烟者中有 38 个具有 p53 突变，而在 21 个非吸烟者中只有 3 个具有 p53 突变，最常见的突变是 GC 到 TA 和 GC 到 AT。这些颠换在肺癌中亦常见，研究认为是香烟中的有机突变诱导剂成分如多环芳香烃苯丙吡啶造成的。相反，近来也有研究显示 p53 表达增加和烟草吸入之间没有关系：9 个非吸烟者中有 5 个显示 p53 改变，14 个重度吸烟者中 9 个显示 p53 改变，二者没有显著差异。

（二）doc－1

研究人员利用金黄地鼠口腔癌模型，克隆到一种新的口腔肿瘤抑制基因，称为 doc－1，中文意为“在口腔癌中缺失－1”。该基因在口腔角质细胞中的突变导致表达和蛋白产量减少。doc－1 在恶性口腔角质细胞中再表达，导致许多恶性表型回复正常，以至转染 doc－1 的口腔

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

癌细胞表型及生物学行为与其正常对应物相似。doc－1 在正常口腔角质细胞生物学中的确切功能目前尚不清楚。可是，通过基因库序列研究，已将金黄地鼠 doc－1 基因与用肿瘤坏死因子 α（TNF－α）在正常鼠科的成纤维细胞中诱导的基因产物相匹配，由此建立起肿瘤杀伤细胞因子与肿瘤抑制基因之间的联系，并提示 doc－1 是 TNF－α 生物性作用如凋亡的下游介导物，现在正在进行有关研究以验证该假说。

（三）凝血酶反应素－1

来自 Noel Bouck 和 Peter Polverini 实验室的一系列杰出研究，将肿瘤诱导的血管生成抑制与凝血酶反应素－1（TSP1）联系在一起。凝血酶反应素是一种位于人血小板 α 颗粒中的主要糖蛋白，它在凝血酶激活时分泌，并在有钙存在的条件下与血小板膜结合，可与纤维蛋白原形成复合物。Moroco 等用金黄地鼠颊囊口腔癌模型显示，在口腔癌发生的过程中血管生成的控制丧失。在恶性角质细胞中这种血管生成的表型调节的丧失，与某种条件下血管中层（肌肉层）中 TSP1 的减少相互关联。

（四）$CDKN_2$ 基因

1994 年，美国盐湖城 Kamb 与 Skolnick 等报道，又发现一种直接参与细胞周期调控的新型抑癌基因——$CDKN_2$ 基因（p16 基因），该基因以其在肿瘤细胞中的高突变率和抑癌作用，在肿瘤遗传学和肿瘤分子生物学的研究中受到广泛关注。

1. *$CDKN_2$ 基因的发现及生物学性质* $CDKN_2$ 基因的发现是真核细胞分裂周期调控和第 9 号染色体的细胞遗传学研究相结合的共同成果。

真核细胞分裂周期调控是由一类蛋白激酶家族即细胞周期素依赖性激酶（cyclin dependant kinase，CDK）调控。该家族各个成员的顺序激活和对关键底物的磷酸化，促进了细胞周期的有序过程，其中，由 CDK_4 和细胞周期素 D_1（Cyclin D1）组成的复合物对控制 G_1 期细胞增殖有较大影响。为了寻找与人类 CDK_4 相关联的蛋白质，Serrano 等利用酵母双杂合蛋白相关性筛选（the yeast two－hybrid protein interaction screen）法发现了一个阳性 cDNA 克隆，编码一个约 16 kDa 的蛋白质，并进一步证实了该蛋白对 CDK_4 的特异抑制作用，故命名为 $p16^{INK4}$。但人类基因组中编码该蛋白的相关基因未能被确定。

另一方面，在肿瘤研究领域，大量资料表明在白血病、非小细胞性肺癌、神经胶质瘤、膀胱癌等多种实体或非实体瘤及体外细胞系中频繁出现人类染色体 9p21 区位的染色体倒置、转位、杂合性缺失、纯合性缺失等染色体异常，提示在 9p21 中含有一个可能与多种类型肿瘤发生有关的抑癌基因座位。此后，对该基因的搜索范围逐渐缩小到 9p 上不到 100 万 bp 的范围内。1993 年，Skolnick 和 Kamb 分别通过对 290 多个肿瘤细胞系的普查，利用染色体步移（chromosal walk）、物理图谱分析（physical map）、DNA 序列分析等技术，终于在该区位发现两个区域与先前报道的 $p16^{INK4}$ 的 cDNA 相近的 DNA 序列，分别将其命名为多种肿瘤抑制基因 1（Multiple Tumor Suppressor 1，MTS1）和 MTS2。现已证实前者所编码的蛋白即为已知的 p16 蛋白，故该基因又被称为 p16 基因，即现已被正式定名的 $CDKN_2$ 基因。而 MTS2 编码的蛋白与 p16 蛋白 93%同源，命名为 p15。

现已知，$CDKN_2$ 基因位于人类 9 号染色体的 9p21 区位，分布在全长为 8.5 kb 的 DNA 区段内，由 3 个外显子和其间的两个内含子组成，3 个外显子长度分别为 126 bp、307 bp、11 bp。编码 1 个 15 845 Da 的蛋白，即 p16，为含有由 148 个氨基酸残基构成的开放阅读框架的单链多

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

肽，该蛋白的大部分由4个锚蛋白(ankyrin)重复序列组成。锚蛋白重复序列为一种结构，存在于一些与巨大靶分子发生识别反应的蛋白质中。例如，在酵母PHO81中有7个锚蛋白重复序列，能抑制PHO80/PHO85的细胞周期素及CDK的复合物，故现在多认为该结构的存在与识别及抑制作用紧密相关。最近的研究发现，p16的改变若发生于锚蛋白重复序列以外，对其功能无影响。

2. $CDKN_2$ 基因的作用机制

(1) $CDKN_2$ 基因的生物学作用

近年的研究表明，细胞癌变与细胞周期失控密切相关。细胞内存在着促使细胞增殖与抑制细胞增殖的两种作用体系，二者的相互作用使细胞的生长处于一种增殖与抑制增殖的动态平衡中，从而保证机体正常生长。促进增殖成分的过度表达或抑制增殖成分的表达不足都会使细胞增殖失控导致癌变。

在真核生物细胞中，细胞周期分为4个时期：G_1 期、S期、G_2 期和M期。在上述时相的转换中有两个关键点(check point)：$G_1 \rightarrow S$ 和 $G_2 \rightarrow M$，两者是细胞周期时相转化的"关卡"。大量的细胞因子均通过在某一个"关卡"发挥作用而确保了一系列分子事件如DNA修复等的完成。其中，CDKs是整个系统的心脏，而CDKs的作用受到一系列正、负调节因子的调控。细胞周期素(Cyclin)对CDKs的活化起促进作用，它可通过与CDKs结合而使之激活。现已发现8种Cyclin，尤以Cyclin D家族对细胞增殖具有最重要的意义。其中Cyclin D_1 与 $CDK_{4/6}$ 结合形成Cyclin D_1/CDKs复合物，作用于某些特定底物如视网膜母细胞瘤易感基因(RB)的蛋白产物pRb，并使之磷酸化，从而解除非磷酸化pRb对某些转录活化因子如 E_2F 等的抑制作用。E_2F 被释放可激活一系列促使细胞进入S期并顺利进行DNA复制所必需的蛋白质(如胸腺嘧啶核苷酸激酶、DNA多聚酶等)表达，使细胞由 G_1 期进入S期，开始DNA合成，进而增殖。而 $CDKN_2$ 基因所表达的p16蛋白在氨基末端有一个与Cyclin Box同源的MX3ADWLATAX4RVE EVX2LL序列，而该序列与Cylclin－CDKs复合物的形成有关。故认为该蛋白可与Cyclin竞争结合CDK而抑制其活性。

(2) $CDKN_2$ 基因的表达调控

$CDKN_2$ 基因通过上述pRb依赖性通路参与细胞周期调控。多数研究者认为，其表达水平同时又受到其下游的pRb反馈调控。推测其机制是：活化的非磷酸化pRb在细胞周期调控中起着"双刃剑"的作用，一方面阻止细胞由 G_1 期进入S期，另一方面抑制着p16蛋白的表达。这一推测在Shapiro等人的研究中已得到证实。作者应用免疫印迹分析和免疫组织化学技术，分别对pRb阳性占多数的非小细胞性肺癌(NSCLC)，和pRb阴性的小细胞性肺癌(SCLC)的手术标本及细胞系进行了测定。结果显示，pRb阳性的NSCLC几乎没有p16表达，而pRb阴性的SCLC有高丰度的p16。Tam和Parry分别研究了不同的体外转化细胞，得到相类似的结果，发现p16过表达的细胞系中均存在pRb的失活。

结合细胞周期的研究，目前认为，生理情况下，在 $G_1 \rightarrow S$ 期转化过程的早期，Cyclin D_1 的水平增高，非磷酸化的pRb在Cyclin D_1－CDK_4 复合物的催化下逐渐被磷酸化而失活，失活的pRb失去对 E_2F 的结合力，细胞进入S期；同时解除对 $CDKN_2$ 基因的转录抑制，促使p16水平增高与Cyclin D_1 竞争CDKs，从而完成 $G_1 \rightarrow S$ 期转化中的调控。当内外刺激因子作用于 $CDKN_2$ 基因并使之受损，或增殖因子的过表达超出了 $CDKN_2$ 基因的代偿能力，或 $CDKN_2$ 基因原发性

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

损伤、改变，失去这一代偿机制，则细胞周期调节失控，细胞过度增殖导致癌变。

(3) $CDKN_2$ 基因与肿瘤的关系

抑癌基因的生物学特点之一是在肿瘤细胞内出现高度的突变和缺失，这种突变与缺失可以表现为单个等位基因杂合性缺失、两个等位基因纯合性缺失、基因内几个碱基缺失或单个碱基缺失、置换等多种情况。自 $CDKN_2$ 基因被报道以来，大量肿瘤基础和临床研究显示，$CDKN_2$ 基因的上述改变广泛存在于多种肿瘤细胞系中。

Kamb 和 Skolnick 普查了来源于包括膀胱、卵巢、肺、神经系统、血液系统等全身各系统在内的共 12 种 290 个肿瘤细胞系，发现除 30 个结肠癌和神经母细胞瘤细胞系外，其余各肿瘤细胞系均有不同程度的 MTS1 基因缺失，缺失率从 25%(肺癌)到 82%(星型细胞瘤)不等，平均为 46%(133/290)。这一数字尚不包括由于所用的序列标记位点图法(STSs)所限，而可能未被检出的数个或单个碱基突变。进一步应用聚合酶链反应—单链构象多态性分析(PCR—SSCP)和直接测序法(DS)检测恶性黑色素细胞瘤细胞系，发现除近 50% 的目标基因缺失外，还有 25% 的点突变发生，从而使该基因的总突变率达到 75%。因此，以 Kamb 为代表的研究者趋于认为 $CDKN_2$ 是一种与多种肿瘤发生相关的肿瘤抑制基因。

然而，Spruck 等的研究显示，尽管 $CDKN_2$ 基因缺失确实在肿瘤细胞系中是常见的，但在原发性肿瘤中，其缺失率仅为细胞系中的 30% 左右，认为细胞系中出现的 $CDKN_2$ 基因改变是人工培养所造成的假象。此后不同研究者分别报道了不同来源的多种原发肿瘤及肿瘤细胞系中 $CDKN_2$ 基因的点突变和缺失等改变，尽管各自的研究方法等尚缺乏可比性，但总的趋势与 Spruck 的结果相似。

Cairns 检查了 75 例已用微卫星体技术证实在 9p21 区位有染色体杂合性缺失的原发肿瘤标本，也未发现 $CDKN_2$ 基因出现缺失，推测 9p21 区位上可能还存在另一个涉及到肿瘤形成的基因。

3. $CDKN_2$ 基因与口腔粘膜癌前损害及鳞状细胞癌　在口腔粘膜鳞状细胞癌及其癌前损害中，对 $CDKN_2$ 基因的研究仅有少量报道，目前对该基因在口腔肿瘤发生发展中的作用尚存争论。

早在 $CDKN_2$ 基因被发现并克隆前，Nowroz 等即提出 9p 是头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)中几个经常出现基因缺失或突变的区位之一(常见区位为 9p3，13q，17p，11p13)。马里兰州的 Peter 对 29 例 HNSCC 和 17 例癌前损害进行染色体杂合性分析，发现 72% 的肿瘤组织和 71% 癌前损害均在 9 号染色体短臂的 D9S165 与 D9S156(9p21～9p22)两个微卫星体之间出现基因缺失，提示该区位的某种抑癌基因的缺失是 HNSCC 发生发展过程中的早期事件。

此后，通过应用 PCR—SSCP 法和 DNA 直接测序等方法，研究口腔粘膜鳞状细胞癌组织及细胞系，不同的研究小组均报道检测到一定比率的 $CDKN_2$ 基因突变。Yeudall 报道了对 14 株 HNSCC 的 $CDKN_2$ 基因突变测定结果，其中 8 株有外显子 1 和(或)外显子 2 的丢失，同时，两个从 HNSCC 的转移灶分离出的细胞株也有 $CDKN_2$ 基因的丢失。Uzawa 在 7 个不同来源的口腔鳞癌细胞系中，发现 4 个出现无义突变和错义突变(57%)，32 例肿瘤组织中发现 2 例出现 $CDKN_2$ 基因的无义突变(6%)，而 25 例癌前损害组织中未检测到任何形式的突变。Zhang 亦报道，曾对 68 例原发性 HNSCC 组织和 9 个来源于 HNSCC 的肿瘤细胞系进行 PCR—SSCP 分析，结果在癌组织中 $CDKN_2$ 的突变率为 10%，在肿瘤细胞系中为 44%。Matsuda 在最近的研究中，

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

对口腔粘膜鳞状细胞癌和癌前损害各 20 例进行 PCR - SSCP 分析，发现 $CDKN_2$ 的突变仅见于 2 例口腔粘膜鳞状细胞癌组织，而癌前损害中无该基因的改变。上述研究所得的共同结论有以下几点：①$CDKN_2$ 基因的突变率远低于以往报道的 9p21 区位基因的缺失率。Zhang 认为有两种可能：一是 $CDKN_2$ 不是存在于该区位的唯一抑癌基因；另一可能是由于 PCR—SSCP 在 PCR 产物小于 200 bp 时能分析出 70% ~ 95% 的突变，其敏感度随 PCR 产物长度的增加而降低，当使用非放射性物质如溴乙锭或银染法显影时其敏感度进一步下降，$CDKN_2$ 的一些小的突变未被 PCR—SSCP 检测出来。这一推测尚有待今后的研究用能更敏感检测突变的方法予以验证。②肿瘤组织中 $CDKN_2$ 基因突变的检出率远低于肿瘤细胞系。说明别的研究者在关于 $CDKN_2$ 基因在全身其他系统肿瘤中作用的争论同样存在于口腔粘膜鳞状细胞癌中。正常组织细胞 DNA 的干扰问题同样需进一步解决。③已经发现的 $CDKN_2$ 基因的突变主要是错义突变和无义突变；其突变的选择并非随机分布，而是相对集中于一些"热点"(hot spot)，但"热点"的位置因肿瘤的类型不同而有所区别。不同组织来源的肿瘤中该基因的突变热点如表 5 - 2 所示。口腔癌中的"热点"多是在第 80 密码子处。突变类型的不同提示肿瘤形成的机制不同。④所有研究均未在口腔粘膜癌前损害组织中发现 $CDKN_2$ 基因的突变。用 p16 多克隆抗体，对 80 例处于口腔粘膜鳞癌发生过程中不同阶段的组织进行免疫组织化学染色，发现在癌前损害中 $CDKN_2$ 的表达虽较正常粘膜增强，但直到浸润癌阶段，这一变化才趋于明显。提示在癌前阶段 $CDKN_2$ 可能仅为一种代偿性表达增加，变异型的 p16 蛋白在浸润癌阶段才出现。这与 Reed 等在对另一具有一系列癌前损害的疾病——黑素细胞损害(melanocytic lesions)的 $CDKN_2$ 基因的改变及表达的研究中所观察到的现象有相似之处。说明 $CDKN_2$ 基因在口腔粘膜鳞状细胞癌发生、发展或转移中的意义还有待进一步的研究。

综上所述，人类染色体 9p21 区位上存在与口腔粘膜鳞状细胞癌相关的 1 个或几个抑癌基因，$CDKN_2$ 可能只是其中之一。在癌前损害阶段，$CDKN_2$ 基因通过代偿性反应对抗细胞所接受到的内外增殖信号，维持细胞周期的调控平衡，从而发挥负性调节因子的作用；而至浸润癌阶段，由于致癌因子的继续作用，使 $CDKN_2$ 基因本身出现突变、缺失等异常而与肿瘤的发生发展有关。

4.*$CDKN_2$ 基因的研究中尚存在的主要问题* 研究显示，原发肿瘤中该基因缺失突变率远低于肿瘤细胞系，使人们对该基因在肿瘤中的作用产生了争论。

以 Sprick 为代表的研究者认为，肿瘤细胞系中 $CDKN_2$ 基因的高突变率是细胞培养的假象，具有 $CDKN_2$ 基因改变的细胞亚克隆更能适应细胞培养环境而获得生长优势。而原发肿瘤中较低的突变率，提示 9p21 区位可能还存在别的抑癌基因位点。

而 Kamb 等则支持 $CDKN_2$ 基因在包括口腔癌在内的多种肿瘤发生中的重要作用，并对原发肿瘤中该基因缺失突变率检出较低的原因提出了如下解释：①检查 $CDKN_2$ 基因的纯合子缺失时，肿瘤组织中非肿瘤细胞的污染掩盖了其缺失的真实情况；②$CDKN_2$ 基因除点突变、缺失外，还存在其他形式的失活机制，如启动子或非编码区的改变，$CDKN_2$ 基因上游序列 CpG 岛的过度甲基化使基因关闭等。陶江川等在 HeLa 细胞系和头颈部鳞状细胞癌的研究中，发现该基因的异常甲基化引起的全长 $CDKN_2$ 基因转录失活，证实了这一推测。

围绕如何排除细胞体外培养及原发肿瘤标本中非肿瘤细胞干扰这两方面的影响因素，解

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

决上述争论，研究者在方法学上予以了各种新的尝试，并已开始见诸报道。Scott 将胰腺癌细胞植入实验鼠体内培养，结果发现鼠的新生肿瘤细胞均出现 $CDKN_2$ 基因的突变或缺失；对比新生肿瘤与所植入的胰腺癌细胞的遗传物质，其序列基本相同，从而认为 $CDKN_2$ 基因的改变不是体外细胞培养的人为结果。同时，Jin 等将 1 个联结有野生型 p16 基因的腺病毒衍生转基因系统，导入无野生型 p16 基因表达的肺癌细胞，发现肺癌细胞系的增殖受抑，细胞周期停滞于 G_1 期。Okamoto 用野生型 $CDKN_2$ cDNA 的表达载体转染肿瘤细胞，能有效地抑制癌细胞克隆的形成，并抑制其体外继续传代。Arap 应用转基因技术将全长 $CDKN_2$ cDNA 导入胶质瘤细胞中，发现可显著抑制其生长，亦从另一角度为 Kamb 的观点提供了有力证据。

四、口腔生长抑制因子和信号转导通路

癌基因的失活可导致促进生长的通路增强，肿瘤抑制基因的失活将削弱生长抑制通路。这些反应能在生长抑制信号转导通路的任何水平发生。有几个细胞外配体是口腔角质细胞生长的抑制因子。TNF－α 和转化生长因子 β（TGF－β）可能在口腔上皮细胞生物学中提供重要的生长抑制信号。业已证明 TNF－α，单独或与 γ－干扰素一起，能阻止恶性口腔角质细胞增殖。TGF－β 是一个角质细胞增殖的抑制因子，其活性有部分归因于一个有名的肿瘤抑制基因，即视网膜母细胞瘤易感性基因（Rb）。尽管在其他肿瘤中，已将 TNF－α 和 TGF－β 与肿瘤抑制基因通路相联系，但它们在口腔癌发生中的重要意义仅仅限于推测。

细胞表面分子在阻止口腔角质细胞增殖中可能也很重要。E－钙依赖性粘附分子（一种与侵袭和转移均有关的具有细胞间粘附作用的分子）在口腔癌中下调。N－CAM 是一种重要的细胞接触抑制因子，它在结肠癌中缺失（DCC），在口腔癌的发展过程中突变。

生长抑制因子的细胞内信使包括结肠腺瘤性息肉病基因（APC）。此基因是一种类 G 蛋白的蛋白，常在某种家族性直结肠癌中突变。近来的证据提示，APC 基因在口腔癌前损害中可能发生改变。

转录因子 Rb，为另一有名的肿瘤抑制基因，研究显示其在一小部分口腔肿瘤中表达降低，但在口腔癌细胞中仍表现肿瘤抑制因子的活性。

视黄醇酸受体（RAR－β）在头颈部癌中下调。目前正在进行利用视黄醇酸预防和逆转口腔癌前损害的研究。

第四节　DNA 修复基因

DNA 的复制和细胞蛋白的产生需要经过多种多样的、复杂的、精密的分子过程。DNA 的破坏主要由外界环境因素如紫外线、电离辐射及化合物造成。DNA 常规处理过程中可能会有规则地发生一些错误，需要一组酶来监督和修复这些错误，这就是 1994 年发现的，第三组特殊的与肿瘤形成有关的基因产物的功能。这些癌症相关基因的显著特征是通过生物模型如 *E. coli* 大肠杆菌和 *Sacharomyces cerevisiae* 啤酒酵母发现的。

一、修复的生物学

DNA 修复有两条主要通路：错配修复和核苷酸剪切修复。错配修复较为简单，在原核生物和真核生物涉及 3 个基因。大肠杆菌中的基因是 mut S，mut L，mut H，而人相应为 hMSH2

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

(mut S),hPMS1(mut L)和hMLH1。错配修复与DNA拷贝引起的错误有关。它作用于单个碱基错配和错位的一段碱基形成的袢,这些情况可见于发生于重复区域(如微卫星)被复制时。人的错配修复基因的突变与散发性结肠癌和遗传性非息肉性结肠癌(HNPCC)有关(图5-5)。

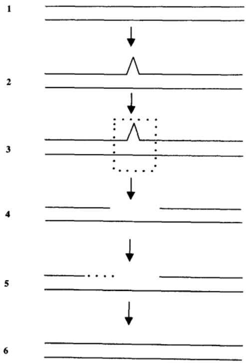


图5-5 DNA错配修复

1.正常双链DNA片段;2.复制过程中一条链整合入了不正确的碱基;3.错配修复蛋白(在细菌中为mut S,mut L和mut S)识别错误,粘附于此位点,并在此错配的一侧产生缺口;4.含有错配修复的片段已经被移除;5.DNA多聚酶及其他的酶开始修复DNA片段;6.正常双链DNA片段

核苷酸剪切修复通路较复杂,在真核生物涉及12个基因产物,在原核生物涉及的基因产物略少于真核生物。剪切修复不能有效地处置在错配修复中提及的不连续的缺陷,但与由化合物和射线等因素引起的更大范围的DNA缺陷有关。剪切修复缺陷引起的典型人类疾病是遗传性疾病——着色性干皮病。

修复酶还有其他两个特征值得注意。DNA剪切修复通路与转录通路有重叠,因为与修复有关的一些基因也具有转录因子的性质。这样,不同类型蛋白的相互作用可解释这些基因出现突变时引起的不同的临床表型。体外研究已表明,DNA错配修复酶缺陷的细胞对抗癌药物如烷化剂的杀伤作用具有更强的抵抗力。其机制尚未明确,但观察所得将对药物耐受的另一途径作出解释,并提供一种方法,通过它可克服耐受性。《科学》杂志已注意到DNA修复酶的生物学特征,并将1994"年度分子"赠予这类复合物(1993年的年度分子是p53)。

二、DNA修复与癌

在抑制癌的形成中DNA修复发挥了重要作用,其证据来源于以下观察所见:①许多少见的人类遗传性疾病的癌易感性和射线敏感性增高;②体外用源于这些遗传性疾病的细胞株所作的研究显示,它们具有染色体不稳定性,对一系列DNA破坏剂的敏感性增高;③通过诱导1个剪切修复基因突变产生的转基因鼠在生命早期就死亡,并证明它具有非整倍性和p53蛋白的增高(即对DNA损伤的反应大);④在结肠癌组织中发现微卫星不稳定性(散发性癌和遗传性非息肉性结肠癌均是)。

3种常染色体隐性遗传性疾病:着色性干皮病、运动失调性毛细管扩张症、范可尼贫血,均显示与DNA修复缺陷一致的变化。这些综合征的相同特征包括:皮肤异常、染色体不稳定性、对紫外线或电离辐射的过度敏感和对一系列的恶性肿瘤的易感性增高。可是,直到将相关基因克隆和特征化,关于这类疾病的某些发现一直是令人迷惑的,因为它们并未提示具有DNA

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

修复的缺陷。3者中，与剪切修复有关的缺陷性DNA修复来说，着色性干皮病最具特征性。这种异常产生了多发性皮肤癌的特征。着色性干皮病基因作为一个转录因子起作用，这可解释该疾病的广泛的临床表现。运动失调性毛细管扩张症少见，发病率为1/40 000～1/100 000，其具有两个主要的特征：运动失调症（与小脑退化有关）和皮肤与结膜毛细管扩张。最近通过定位克隆识别了运动失调性毛细管扩张症基因。该基因被称为ATM(ataxia telangiectasia mutated)。运动失调性毛细管扩张症的其他表现包括生长延缓，免疫缺陷，易患白血病、淋巴瘤、乳腺癌和对电离辐射敏感。该基因与细胞周期调节有关的重要蛋白具有同源性，这一特征可解释其广泛的临床表现。与DNA修复有关的第四种综合征是Bloom综合症，它与几种出生前后的生长缺陷、面部红斑和免疫缺陷有关。患Bloom综合症的个体具有发生多种恶性肿瘤的高危性，并易发生染色体断裂。可是，将Bloom综合症归于DNA修复缺陷一类可能不太合适，因为受累个体通常并不显示对紫外线和X－射线的过度敏感。Bloom综合征基因(BLM)是在1995年克隆的，在将其与大肠杆菌中的一个基因家族作同源性比较后，认为BLM是一种DNA解链酶。因此，该基因的缺陷对DNA复制的干扰较对修复的干扰更大。目前尚需对BLM进行进一步研究。

在分子水平，1993年的发现就提示遗传性非息肉性结肠癌(HNPCC)与DNA错配修复基因缺陷有关。当时观察到肿瘤组织中的微卫星是不稳定的，即是说，与存在于同一个体正常组织中的等位基因相比，微卫星中有其他的不同大小的等位基因。同年，hMSH2基因克隆成功。该基因与DNA错配修复有关。1994年，3个具有类似功能的基因——hMLH1，hPMS1，hPMS2被分离。DNA的同样变化可见于约15%的散发性结肠癌。这些基因在癌形成中的确切作用尚待明确。就现实意义而言，DNA突变的发现为检测危险家族成员提供了一种方法。

迄今为止，有关DNA修复基因与口腔癌及口腔其他疾病的研究详见本章第八节。

第五节　外源因素致口腔癌的分子基础

一、环境因素致口腔癌的分子基础

（一）实验模型

产生肿瘤的理化物质也能引起DNA的特征性变化（表5－4）。用致癌物质诱导癌发生的动物模型证实，肿瘤细胞的优势突变能反映所用化学物质的类型。例如，用亚硝基甲脲诱导乳腺癌的鼠具有原癌基因H－ras G到A的突变。相对的，用二甲基苯丙蒽对老鼠诱导的皮肤肿瘤有DNA的A到T的突变。

表5－4　DNA变化与致癌物质

致癌物质	DNA中的变化
一些烷化剂	G－A转换[a]
苯丙吡啶	G－T颠换[b]
Melphelan	A－T颠换
电离辐射	缺失
紫外线	CC－TT双核苷变化

a 转换，从嘌呤到嘌呤或从嘧啶到嘧啶的变化　b 颠换，从嘌呤到嘧啶或从嘧啶到嘌呤的变化

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

(二)致癌物质

从南非到东亚,肝细胞具有一致性的DNA变化,即p53基因密码子249中G(鸟嘌呤)颠换为T(胸腺嘧啶)。这一发现提示,除早先提到的乙型肝炎病毒以外,环境性因素(例如,黄曲霉毒素B)是肝细胞癌可能的危险因素。在实验性突变分析中,黄曲霉毒素B1更易与GC富集区的鸟嘌呤残基结合,并诱导同样的G到T的变化。G到T的颠换也可能是氧化剂的结果,而氧化剂的产生与紧接着的慢性肝炎的炎症过程有关。作为对比,结肠癌中p53突变中占优势的是转换,即是说,它们更可能是内源性自然发生的,而不是继发于外来的突变原。

环境与肿瘤形成具有相关性的另一个例子是皮肤癌。紫外线诱导的突变在体外变化具有特征性,这些变化包括在双嘧啶区频繁的C到T的突变。紫外线损害的诊断依据是CC到TT二核苷酸的变化。这些频繁的突变见于皮肤鳞状细胞癌中的肿瘤抑制基因p53。这就提供了日光对皮肤发生相关性肿瘤具有一定作用的客观证据。在DNA水平,已清楚地认识到了吸烟、头颈部癌和p53基因之间的相关性。

流行病学资料提示,吸烟、酒精消耗量与头颈部鳞状细胞癌的发生发展具有一定关系。实验亦证明,吸烟、酒精消耗量等环境因素与头颈部鳞状细胞癌的发生发展具有一定的相关性。将一群头颈部癌患者分为3组:①吸烟并喝酒;②吸烟但不喝酒;③不吸烟不喝酒。对3组肿瘤标本的p53基因进行研究。有2个发现:①既吸烟又喝酒组与既不吸烟又不喝酒组相比,p53的突变更常见,是后者的3.5倍;②在既不吸烟又不喝酒组中观察到的突变,与自发发生的p53缺陷而非由外源性突变原诱导的缺陷更一致。由于CpG区是DNA天然发生突变的热点,故产生颠换突变不如产生转换突变常见。若发现颠换占优势,则提示有外源性因素的参与。尽管对于统计确认来说标本量还不足,但确实在既不吸烟又不喝酒组中,发现大多数突变发生于CpG区,且以转换突变占优势。另一个所见是大多数p53突变产生去头蛋白。这样,如果与上述类似的研究利用了蛋白而不是DNA作为P53的标志,不完整的p53蛋白将导致假阴性结果。

二、人类乳头状瘤病毒与口腔癌

有关人类乳头状瘤病毒(HPV)的基因结构及一般致癌机制,在本书的第四章中已有较详细的叙述。在此,重点介绍该病毒与口腔癌发生的相互关系。

(一)HPV与头颈部肿瘤体细胞突变

HPV致癌作用的分子机制提示,其在p53和(或)Rb的外因失活及由这些基因引起的细胞周期控制紊乱中起中心作用。了解了这些,人们可能会认为就不需要直接的突变以及这些基因的进一步失活。

早期对宫颈癌的研究资料表明,肿瘤中p53基因突变与HPV的存在是完全不相重叠的,即所有HPV阴性肿瘤p53基因突变是阳性的,反之亦然。而根据较近期的研究,报道有少量的p53突变和HPV均存在的肿瘤。HPV、p53和其他细胞周期调控基因在头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)中的关系是不同的,而且可能更为复杂。Rb的变异见于HNSCC不到10%,因此其他参与细胞周期调控的基因上游(相对于Rb)区的改变,及HPV的外因作用可能参与破坏细胞周期的调控。一些HNSCC的研究,证实了包括p53、p16肿瘤抑制基因和周期素D1(PRAD-1癌基因)在内的数种参与细胞周期调控的基因改变。目前的资料显示,约42%的HNSCC中有p53变异,p16在约67%的肿瘤中有缺失,并且在另外的21%中通过启动子的甲基化而失活。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

细胞周期素 D_1 在 30%的肿瘤中有扩增。只有少量的研究评价了 HPV 与这些基因改变之间的关系。

通过这些研究发现，似乎这些基因的改变与 HPV 的存在不完全一致。对 33 例 HNSCC 的研究发现，在 HPV 阳性的 5 例肿瘤中，1 例有 p16 的缺失，1 例有 p53 的突变。人们已知烟草可引起 p53 的突变，也可能引起其他基因如 p16 的突变，在 HNSCC 的发病中起重要作用，因此毫不奇怪，人们将很难清楚地证实感染 HPV 是唯一的致病途径。HPV 癌蛋白和其他基因如 p16、细胞周期素 D_1 等可能在某些肿瘤中协同起作用，引起细胞周期紊乱，而在另一些肿瘤中则独自起作用。迄今尚没有动物模型可以用于直接研究 HPV 与口腔致癌作用间的关系。人们仍需进行分子流行病学的研究，以更深入地评价烟草、HPV 和其他基因改变在头颈部致癌作用中独自的和联合的作用。

（二）HPV 致口腔癌的分子证据

杂交技术（Southern 杂交、斑点杂交、原位杂交）用于检测细胞和组织中特定病毒基因序列。Southern 杂交和斑点杂交技术需从标本中提取纯化 DNA。在 Southern 杂交中，用限制性酶消化 DNA，依片段长度不同加以分离，固定于滤纸上，然后用已标记了放射性或化学发光物的特异性探针对待测 HPV 亚型的探针进行检测。这种标记的单链病毒 DNA 或 RNA 探针与互补链退火形成双链杂交物。原位杂交不需从组织中分离 DNA，可以在组织或涂片中直接检测存在的病毒序列。

总特异性的 HPV 寡核苷酸探针，通常选自所有 HPV 基因中的高度保守区，而型特异性的探针则来自特殊 HPV 亚型的独有序列。探针与互补链的退火能力有赖于两序列间的一致程度和反应条件。通过改变离子强度、溶解温度和核苷一致程度，杂交反应的特异性可以在低到高严格度之间变化。多数研究中，检测最高可能 HPV 阳性标本数（低严格度）和特殊 HPV 亚型（高严格度）的实验已可重复。

Southern 杂交已被认为是 HPV 基因分型的金标准。尽管它需要约 10 ng 的 DNA，但每个细胞 0.1 拷贝的 HPV DNA 即可被相应探针检测到。Southern 杂交还可检测出病毒基因是附加体（可在细胞中染色体外自动复制）还是整合于宿主染色体上。然而，Southern 杂交操作烦琐复杂，不同实验室间的检测和分型有明显差异。Brandsma 等用分离的 DNA 复制物进行了 4 个实验室 HPV 分型的比较。尽管都使用了 Southern 杂交技术检测 HPV，其结果只有 45%（17/38）是一致的。

斑点杂交技术是一种较快速的检测技术，因其只需要相对较少的 DNA 量（300～500 ng），故可用于筛选大量标本。斑点杂交不需要在杂交前用限制酶消化标本 DNA 和凝胶电泳，只须将提取的 DNA 变性，附着于膜上，并与特异的 HPV DNA 探针杂交。斑点杂交技术可以敏感地检测每个基因组 1 拷贝的 DNA，相当于滤纸上 500 ng 的细胞 DNA，但斑点杂交不如 Southern 杂交的特异性好，而且不能区分 HPV 基因组是附加体形式还是整合形式。

通过原位杂交可直接在组织切片上检测 HPV，因而保存了组织形态，可在特殊细胞和组织中定位 HPV DNA。因为每个标本中的病毒拷贝数不同，所以尽管该技术可检测到低拷贝数的病毒基因数，但该技术的敏感性还不能被精确估计。原位杂交技术操作繁琐。因为可与细胞片段发生交叉杂交，而且不能区分假阳性，因而其在低严格度时结果不可靠。

人们已将杂交技术应用于研究 HPV 在使细胞向恶性表型转化过程中的作用。大部分研究开展于上呼吸道和上消化道，标本常取自口腔、咽喉的不同部位的少量组织。经过杂交技术

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

评价的良性和癌前病损包括乳头瘤、白斑、非吸烟性烟草角化、湿疣、局灶性上皮角化(FEH)、疣、扁平苔藓、纤维瘤和异常增生。将所有头颈部良性和癌前病损(n = 1 098 例)的研究结合起来看，平均有20.1%(范围为7% ~ 100%)为HPV阳性(表5-5)。该平均值是以通过特异方法测得的HPV阳性例数之和为分子，以所有检测标本之和为分母而得来。Southern杂交所测的头颈部良性和癌前病损的HPV平均阳性率为35.9%(范围为11% ~ 88%)，斑点杂交技术为23.5%(范围为0% ~ 100%)，原位杂交为18.5%(范围为7% ~ 100%)。HPV11(23%)略多于HPV16(22.2%)和HPV6(10.4%)。HPV阳性的良性和癌前病损中，HPV6/11双重感染占21.7%，HPV16/18双重感染占6.8%(表5-5)。

表5-5 杂交技术检测的人类乳头瘤病毒(HPV)在良性和癌前病损中的阳性率

病损类型	Southern杂交	斑点杂交	原位杂交
乳头瘤	60.0%(6/10)	17.2% (5/29)	30.5%(47/154)
白斑	11.8%(6/51)	NS	2.6%(55/438)
非吸烟烟草性角化病	81.8%(9/11)	100%(2/2)	6.8%(5/74)
湿疣	NS	NS	100%(17/17)
局灶性上皮过度角化	NS	NS	62.5%(5/8)
寻常疣	NS	0.0%(0/1)	46.7%(14/30)
扁平苔藓	87.5%(7/8)	NS	25.0%(6/24)
纤维瘤	NS	NS	17.9%(19/106)
异常增生	41.7%(5/12)	50.0%(1/2)	9.9%(12/121)
总计	35.9%(33/92)	23.5%(8/34)	18.5%(180/972)

缩写说明;HPV+:HPV阳性;NS:未找到资料;* 头颈部良性和异常增生病损：221/1 098(20.1%)是经杂交检测的HPV+。总受试人数 = 1 098。总HPV+人数 = 221

通过杂交方法检测的头颈部(口腔、咽和喉)的鳞状细胞癌(SCCs)中，HPV阳性率平均为15.8%(表5-6)。Southern杂交中24.5%的SCCs HPV阳性，而斑点杂交和原位杂交的HPV DNA阳性率分别为6.3%和18.2%。通过任一杂交技术检测可得，在HPV阳性肿瘤中HPV16占49.4%，HPV18占0.2%，并有1.7%的HPV16/18双阳性。标本中HPV6占9.2%，HPV11占7.6%。

表5-6 分子生物学方法检测的头颈部鳞状细胞癌中人类乳头瘤病毒(HPV)的阳性率

实验方法	HPV阳性率(%)
Southern杂交	24.5(66/269)
斑点杂交	6.3(20/319)
原位杂交	18.2(52/286)
PCR	34.5(416/1 205)

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

PCR 技术可应用于细胞悬浮液和福尔马林固定石蜡包埋的肿瘤组织的 DNA 提取物，选择高度保守的寡核苷酸引物对可探测较广的 HPV 亚型。最常用的方法是在 L1 基因的高度保守区内选择一致的引物对。型特异性低聚物用以鉴别不同的 HPV 亚型。E 基因组特异性和型特异性引物对也用于 PCR 检测。PCR 之后常用 Southern、斑点，或原位杂交方法以确定其产物。

尽管 PCR 大大提高了 HPV 检测的敏感性，但该方法易受环境无关 DNA 的污染或引物选择差异的影响 。PCR 可产生错误的假阳性结果并促进重新联合的发生，从而引出多种病毒亚型“双重感染”的概念。人们已报道了应用 E 和 L 基因设定的引物检测 HPV 阳性率的差别。尽管 PCR 可能存在污染问题，但通过一致的、细致的取材和操作，不同的实验室已取得高度的一致性。

已有头颈部 SCCs 的文献中，PCR 检测的 HPV 平均阳性率为 34.5%(416/1205)，而所有杂交方法为 15.8%，Southern 杂交为 24.5%。各研究的标本含量在 4 例至 187 例肿瘤之间。在 PCR 检测的 HPV 阳性的标本中，40% 为 HPV16，11.9% 为 HPV18，7.0% 同时具有 HPV16 和 18。另外，3.8% 的肿瘤有 HPV6；7.4% 有 HPV11，10；9% 同时有 HPV6 和 11。疣状癌为 SCC 的一种变异，未列入表 5-6。通过 PCR 或原位杂交测得疣状癌中 HPV 的阳性率为29.5%(16/54；其中 9 例 HPV18，4 例 HPV16，2 例 HPV6，1 例 HPV16/18)。

研究人员还报道了头颈部不同部位 SCCs 的 HPV 阳性率。PCR 测得的 HPV 总的阳性率在口腔的 SCCs 中最高(59.0%)，包括扁桃体(77%)，口底(44%)，颊粘膜(59.0%)，舌(35%)和腭(42.8%)。33% 的喉部肿瘤和 43% 的咽部肿瘤 HPV 阳性。

应用 PCR 检测发现，75% 的 HPV 阳性(HPV+)口腔 SCCs，66% 的 HPV+扁桃体癌为 HPV16。65% 的 HPV+口底癌，62% 的 HPV+舌部肿瘤和 25% 的 HPV+腭癌中可探测到 HPV16。HPV16 尚可在 46% 的 HPV+喉部肿瘤和 100% 的 HPV+咽部肿瘤中检测到。据报道，HPV18 在 30% 的口腔 SCCs 和 15.9% 的咽喉部 SCCs 中与 HPV16 共存。其他的 HPV 亚型在头颈部肿瘤标本中不常见，但发现有 HPV 亚型 33，30，31，3，13，57，2 的 DNA 存在和 HPV16/33 的共同存在。

(三)头颈部 SCCs 中 HPV 感染有关的其他因素

只有少数研究系统检测了与头颈部 SCCs 中 HPV 感染可能有关的其他因素。Cruz 等(1996)应用 PCR 技术发现，35 例口腔 SCCs(19 例，或 54% HPV+)HPV 的情况与年龄明显相关。60 岁以下患口腔 SCC 的人群中其感染 HPV 的机率是 60 岁以上人群的 8 倍[相对危险度(OR)=8.4；95% 可信区间(CI)=(1.5，53.9)]。在这个研究中，男性 HPV 阳性的可能高于女性(分别为 66.7% 和 35.7%)，但是没有发现 HPV 感染与肿瘤位置、诊断阶段，或烟酒嗜好有关系。Snijders 等(1996)在使用 PCR 对 63 例头颈部 SCCs 的研究中，认为 HPV 状况与烟酒嗜好无关。Miller 等(1994 年)在其研究中发现双重 HPV 亚型感染的肿瘤，尤其是 HPV16 和 18 的双重感染人群，其平均年龄显著低于那些单种 HPV 亚型感染的人群(59.4，$P<0.005$)。此外，在 24% 的标本中存在双重感染，并且主要发生在男性。最近的研究报道，在 10 例有头颈部 SCCs 的非吸烟患者中有 5 例发现了 HPV16。与之相比，有吸烟史的 177 例患者中有 15 例(8.5%)有 HPV16 的感染[(OR=10.8；CI=(2.8~41.6)；$P=0.03$)]。所诊断的非吸烟患者的平均年龄为 69 岁。

在感染人类免疫缺陷病毒(HIV)的个体中，口腔病损是常见的。许多病损与口腔毛状白

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

斑中 EB 病毒感染有关,其他则与单纯疱疹病毒感染有关。而 HPV 诱导的口腔乳头瘤并不常见。但在生殖器病损中,HIV 的感染并不增加其癌基因的 HPV16 和 18 亚型引起病损的危险性。病例对照研究,具有有效对照组的流行病学研究可以提供更多的资料,例如,正常口腔组织的 HPV 检出率和其他危险因素(例如吸烟),它们可以直接与病例组(有 SCCs 的病人)比较。至今,很少有关于头颈部 SCCs 中的 HPV 的研究采用了这种设计。Brandsma 等进行了病例对照研究,比较了 214 例 SCCs 和 114 例解剖部位相匹配的正常组织(对照)中 HPV DNA 的阳性率。作者并没有给出选择病例组和对照组的标准。正常组的标本是通过非肿瘤相关外科手术获取的。通过 Southern 杂交分析,作者发现在 SCCs 中 HPV 阳性率低(5%),对照组甚至更低(4%)。有 2 例喉部正常标本有 HPV11 和 16 的双重感染。Maden 等(1992)进行了人群病例对照研究,调查男性中 HPV 感染和口腔 SCCs 的发生情况。脱落口腔细胞标本来自于使用软毛牙刷的 131 例病人和 136 例对照人群。经 PCR 分析,校正年龄、吸烟饮酒量的因素后,发现感染 HPV16 的人群发生口腔癌的可能性是未感染 HPV16 的人群的 2.8 倍(95%CI 1.1,7.3)。未校正的 HPV16 在口腔 SCCs 患者中的感染率有升高,但统计学上无显著差异[(OR = 6.2;95% CI = 0.7,52.2)]。

(四)HPV 检测的临床意义

人们对 HPV 在头颈部肿瘤预后中的意义知之甚少。有 3 个研究直接分析了肿瘤中 HPV 存在、临床病理特点和存活之间的关系。Brandwein 等(1993)测定了 40 例福尔马林固定石蜡包埋的喉部肿瘤标本中 HPV 的表达。有 3 例肿瘤 HPV 阳性(8%)。40 例病人只有 25 例获得了随访。3 例 HPV 阳性肿瘤患者中,2 例分别在确诊后 3 个月和 16 个月时死亡,而所有 HPV 阴性的患者均存活。肿瘤大小似乎不能解释这种区别。该研究组也检查了 64 例口腔癌,发现 16 例 HPV 阳性(25%),但并未报道阳性标本中 HPV 的特殊类型。在 HPV 阳性率、T 分期、临床分期以及肿瘤分化之间没有统计学联系。疾病缓解期和生存时间的长短在 HPV 阳性和阴性组间无区别。HPV 阳性和阴性晚期肿瘤患者的存活时间无差异(T3/T4;Ⅲ和Ⅳ期)。Clayman 等发现 46%(35/65)的喉和喉下部肿瘤中可检测到 HPV DNA。病例组的平均随访时间为 42(± 21)个月,并把 HPV 的存在与Ⅰ、Ⅱ期患者($P = 0.25$)和Ⅲ、Ⅳ期患者($P = 0.014$)相联系。但没有发现 HPV 阳性率与标准病理分期参数之间的关系。资料显示 HPV 至少可以象其他因素(如病理分期、喉外扩散、血管浸润、声门下扩散、淋巴结阳性)一样可预示存活时间。HPV 的存在对局部复发的相对危险度为 2.4。在 Snijders 等应用 PCR 对 63 例头颈部 SCCs 的研究中,未将 HPV 的状况与肿瘤部位、分化程度和存活时间相联系。

目前的文献太有限,不能对 HPV 在临床预后中的意义作出明确说明。多数前人的研究受限于患者数量较少、肿瘤部位不同、随访时间不等,以及在校正临床参数基线后不能充分分析存活与复发。Clayman 等(1994)的研究提供了有意义的结果,有助于对以后的关于上述方法学的研究的深入评价。因为还未明确 HPV 在头颈部癌中的病因作用,而且对生存的研究也有限,所以与头颈部癌相关的 HPV 的临床意义仍未明确。如果资料显示 HPV 是一个重要的独立的预后因子,病理材料和相对直接的 PCR 方法可能会用于诊断和治疗。

总之,通过使用以 PCR 为基础的技术,HPV DNA 已在多种类型和部位的头颈部组织中检测到。HPV 总阳性率(约 40%)虽未达宫颈癌中的阳性率的水平,但也是有意义的。头颈部 HPV 阳性肿瘤中,高危型 HPV 以 HPV16 占主要地位,为其在病因学中的重要作用提供了更深入的证据。然而,仍需做一些其他方面的研究。有关该病毒的物理状态,以及包含从正常细胞

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

到肿瘤细胞的标本中该病毒癌蛋白的表达的基础研究，可能有助于了解 HPV 感染及恶性转化的进程。了解 SCCs 和其他病损中 HPV 与细胞周期调控基因，例如 p53 和 p16 的相互作用的确切本质也很重要。

经过仔细检查和系统确定的 SCCs 病例组与有效对照组的流行病学的研究，为 HPV 感染与 SCCs 主要危险因素——烟和酒之间的关系提供了重要资料。有关年轻患者（<40 岁）、不吸烟者，以及不饮酒者中 HPV 感染的研究将会有价值。这些研究也可收集有关传播途径相关因子的其他资料。研究应结合足够数量不同部位的头颈部肿瘤，以评价其部位特异性。使用高产 DNA 方法对正常口腔粘膜细胞标本的进一步评估，可使人们了解潜伏 HPV 感染的流行及重要性。目前关于 HPV 与存活关系的文献很少。临床研究也可通过病例对照，以及随后对病例进行有关肿瘤的临床特点、HPV、协同因子和生存方面的评估而取得有效结论。

第六节　口腔癌发生的分子模型

由于多因素方法如分子生物学、病毒学、流行病学、基于生物学原则的临床试验的应用，人类癌症的分子基础正被迅速揭示。关于过去 5 年中随着口腔癌的新的知识的大量涌现，我们能推论导致口腔癌的遗传性改变的环节。尽管口腔癌的发生通常认为需要 6～10 个遗传性环节发生改变，但已知基因的改变和尚未识别的癌基因和肿瘤抑制基因的重要性尚不完全了解。此外，导致口腔癌发生的遗传性改变可能依赖于种族、地域，或易感危险性因素的不同而不同。口腔癌似乎是通过一系列组织病理学亚型发生的：正常口腔粘膜变为过度增生，然后发展为异常增生，不同水平的原位癌，侵袭性和转移性癌。同样，导致口腔癌发生的多种遗传性事件，包括以一个首选的而不是绝对顺序的癌基因的激活或肿瘤抑制基因的失活的过程。

更确切地说，这些突变的积聚有助于恶性表型的产生，获得这些突变的不同顺序可能有助于不同的临床表型的产生。图 5-6 显示了具有遗传性损害发生并对口腔癌的发生很重要的可能模式。图中显示，正常口腔粘膜向恶性和转移性肿瘤的发展，是受癌基因的激活和肿瘤抑制基因的失活所推动。如同其他癌发生的模式一样，癌基因在细胞转化的早期占优势，而肿瘤抑制基因在恶性和转移性肿瘤的引发阶段才被激活。虽然这是一个目前多数学者认可的学说，可是，不同类型的口腔癌具异质性。此口腔肿瘤发展模式提出了已经识别了的遗传性改变发生的顺序，它虽是首选但不是绝对的。随着口腔癌的生物学相关问题的阐明，相信这一模型将被不断更新。

第七节　口腔癌的分子诊断

目前有关口腔肿瘤生物学的新知识尚未完全应用于临床。口腔癌发生的分子机制的研究并不仅仅是一个纯理论的探讨过程。通过识别口腔癌发生过程中的遗传性变化，我们将能通过采取预防措施来降低口腔癌的发病率和死亡率。

相关的应用研究涉及到口腔癌的诊断与治疗。首先是企图将这些分子事件作为肿瘤标志物。如已有研究指出，可以通过多聚酶链反应技术，检测口腔癌患者的唾液中脱落角质细胞的 p53，筛选潜在的复发口腔肿瘤，并通过分析突变的类型来区分第二个原发灶或复发性肿瘤，因为第二个原发灶一般具有较原发性肿瘤不同的突变。光学显微镜在评价肿瘤切除边缘方面存

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

在着一定的局限性，现在可通过用突变的 p53 作为一个阳性边缘的标志物指导临床手术，从而降低局部复发的危险性。

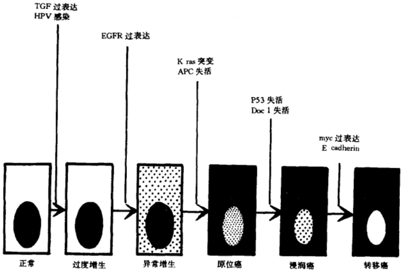


图 5-6　口腔癌的分子发病模型

遗传性损害在预测肿瘤生物学行为中很重要，尤其对“癌前”损害的转化更是如此。增高的 C-myc 表达及 18q 染色体上的改变常常预示着较差的预后。也有研究显示 E-钙依赖性粘附分子是一种具有转移潜力的潜在预告指标。

应用遗传性标志来预测肿瘤对目前治疗措施的反应也有一些研究。染色体 1p22，3p21，8p11 和 14q 上的断裂点与放射敏感性降低有关。增殖标志，组蛋白 H3，也可作为对放疗反应的预报标记。将来，相信分子标志可以广泛应用于预测口腔肿瘤的生物学行为，及对治疗的反应性和转移的潜力。

对口腔癌发生的分子机制的了解还有助于我们开展“分子手术”，以通过在分子水平对细胞进行程序重调治疗该病。体细胞的基因治疗提供了许多可能的优点。了解口腔癌中的分子缺陷可为目前的治疗提供新的辅助手段。有关具体的内容，请详见本书的基因治疗一章。

基因治疗头颈部癌患者的临床试验已落后于对该疾病的研究，已提出的几个治疗其他肿瘤的方法，可被直接治疗口腔癌的基因治疗者所接受。免疫反应可通过提高用抗肿瘤基因（例如白介素-2 或 TNF-α）处理的肿瘤浸润淋巴细胞的肿瘤杀伤潜力，或通过再植入用化学诱引剂（如白介素-4）增加的肿瘤细胞来提高，已检查到宿主抗肿瘤反应的增加。癌基因和肿瘤抑制基因也能通过基因治疗进行操作。通过表达阻止 mRNA 翻译成蛋白的“反义”寡聚核苷酸，可阻断癌蛋白的产生。生长因子及其受体能被抗体阻断，由此去除其刺激增殖的能力。在动物模型上进行的研究提示上皮生长因子受体（EGFR）的抗体阻止肿瘤生长，而且生长因子可被作为过度表达其受体的癌细胞毒素的载体。肿瘤抑制基因的再表达能导致恶性表型的逆转。尽管经计算口腔癌的发生必需有 10 个遗传性损害，在 1 个治疗性效应能被实现以前使所

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

有改变正常化可能是不必要的。这些基因如 p53 和 doc－1 在口腔角质细胞中将使恶性向正常转换，提示我们也应具有在口腔癌患者中进行相同工作的能力。基因治疗也可通过对能根除肿瘤营养来源的抗血管形成因子的操作来引导。最后，新的基因可被加入肿瘤细胞，例如疱疹胸腺嘧啶激酶基因，它将使细胞对目前的化疗药物更敏感。可是，当我们继续识别人类疾病的关键基因，并创造将它们传递给有病的细胞的合适媒介动物时，人类疾病的基因治疗停滞了。不能转染 100％的肿瘤细胞将使基因治疗局限为一个辅助手段，而不是外科手术的替代疗法，因为其能力是使口腔肿块缩小而不是根除。

第八节　口腔癌的遗传易感性

一、肿瘤易感性的概念

目前认为，肿瘤细胞内存在的突变是环境因素与宿主自身因素相互作用的结果。许多资料表明，人群中有特殊的群体因种族、性别、遗传等的差异，对特殊的致癌物或特殊的肿瘤易感。所谓肿瘤易感性指的是：个体由于先天遗传或后天体质等的差异在相同的致癌环境影响下发生肿瘤的机率、发生的早晚均存在差异。这种由个体内在因素决定的机体对致癌因素的生物抵抗特性，被称为肿瘤易感性。这种个体间的差异可决定个体对致癌外在因素的敏感性、发生异常增生后向恶性转化的速度，以及复发与再发的机会等。

已有的研究表明，某些少见的高外显率的显性基因突变，可导致个体对致癌环境因素的高度易感性，表现为各种肿瘤综合征，例如：着色性干皮病、毛细血管扩张性共济失调、家族性结肠息肉症、Wilms 瘤、Blooms 瘤等。但这些基因的先天性突变携带者仅占人群的极微小的百分比，在肿瘤患者中比例不到 5％。而普通人群中，遗传素质的差异是由多基因或由外显率较低的遗传多态性基因控制的微小差异组成。Frederica 总结了近年来对于肿瘤易感性的研究进展认为：肿瘤易感性与环境致癌因素间的复杂相互关系，将决定个体是否发生肿瘤，这种易感性由多基因控制；而这些多基因的作用又常受到种族、性别、年龄、后天的体质状况、营养状况，以及暴露于多种环境致癌因素的累积量等相关因素的调控或影响。

随着对个体素质的差异在肿瘤发生中的重要作用的认识，对头颈肿瘤是由致癌环境因素与个体肿瘤易感性两种关键因素间相互作用的结果的认识，已受到了相关领域研究者的逐渐重视。目前，头颈部肿瘤易感性的研究在以往头颈部肿瘤研究领域的基础上，以及近年来肿瘤易感性研究的发展动向的引导下，正得到不断的扩展和深入。

二、头颈部肿瘤易感性的临床证据

笔者在临床上偶可见到局部白斑治愈后，或是头颈鳞癌早期治愈后不久，口腔粘膜的其他部位发生新的白斑的病例，这类病例的治疗及其复发的控制，在临床上又极为棘手。国内近年来的文献亦见有类似的报道。在生活中或临床上仔细分析可以发现，同是长期的高频率吸烟者，因个体间的差异，其发生头颈癌与否及先后都有显著差异；有些头颈部肿瘤患者不能找到相关的明显致病因素，而这类患者往往病情发展快，复发率高。这些现象都提示个体的内在素质差异对头颈部肿瘤的发生有重要作用。

八九十年代，头颈部肿瘤的治疗方面有了较为成熟的方法：在早期阶段可通过手术、放疗、

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

化疗加以治疗，对中晚期肿瘤进行清扫术并配合放、化疗，对头颈癌患者来说增加了许多挽救生命的机会。但 Franceschi 等的统计学资料显示：该类患者 5～10 年的复发率、死亡率并没有得到明显的提高。究其原因，可能是由于头颈部肿瘤的多发性原发灶及再发型原发肿瘤所致。80 年代，许多研究者已相继报道过头颈部多发性原发性肿瘤的现象，但对其本质缺乏足够的认识。Copper 等在研究一些散发性的家族发病率较高的头颈肿瘤患者人群时，也发现头颈部肿瘤与个体的内源性因素明显相关。Bongers 对 97 例发生再发性原发病灶的头颈鳞癌患者及 100 例经治疗后 6 年以上尚未发生继发肿瘤的相同患者进行了调查（两组患者均为吸烟者），发现前者的 562 位家庭成员中 50 例（8.9%）存在呼吸或上消化道肿瘤史，后者的 629 位家庭成员中 16 例（2.5%）存在呼吸或上消化道肿瘤史，二者间具有显著差异（$P<0.0001$）。家属中存在呼吸或上消化道肿瘤是一个发生再发性原发灶肿瘤的危险因素[OR = 3.8，95%CI = (2.0～7.6)]。Cox 等总结印度的粘膜下纤维性变患者的 10 年随访观察研究结果，发现 7.6% 的病例发生口腔癌，而遗传因素决定的易感性是咀嚼烟草等习惯的人群发病及转化与否的重要危险因素。说明遗传性肿瘤易感性在发生头颈再发性原发灶肿瘤中起着内源性因素的作用。这些病因与发病不平衡，多发性原发灶、再发性原发灶、家族相对积聚等现象，说明头颈肿瘤发病及转归中个体内在素质或遗传差异的重要作用。

从目前对肿瘤发生机制的认识及肿瘤易感性研究的方向来看，影响肿瘤易感性的因素主要包括：①某些肿瘤相关基因的遗传多态性；②宿主细胞 DNA 修复系统多态性；③某些致癌剂代谢相关基因或致癌剂作用受体基因多态性等几个方面。图 5－7 简要总结了在口腔发生发展过程中，相关的主要内、外因素的相互作用。

（一）肿瘤相关基因多态性

尽管已发现很多肿瘤相关的癌基因、抑癌基因的胚系突变，可致不同的对特定肿瘤高度易感的肿瘤综合征的表型个体，且在各个演化阶段的头颈部肿瘤标本中可查到许多癌基因的突变，但目前似乎还没能找到典型的胚系突变所致的头颈部肿瘤综合征的病例。而肿瘤相关基因的多态性与头颈部肿瘤的易感性，也是 80 年代末期后才见到零星的相关报道。

Vries 等发现：头颈肿瘤患者的 HLA 及同种抗免疫球蛋白型别，与多发性原发性肿瘤患者有一定的相关性。Matthias 等的研究发现，$CCND_1$ 基因型在分化差的肿瘤患者与分化好及分化中等度的肿瘤患者中存在显著差异，$CCND_1$ * G（GG）基因型与低分化者相关，且与无疾病间隙期（disease－free interval）缩短相关。他认为该基因型可作为头颈鳞癌的一个独立的预后指标，与个体肿瘤的生物学独特性密切相关。肿瘤坏死因子（tumour necrosis factor，TNF）基因位于染色体 6p21 的主要组织相容性复合体（the major histocompatibility complex，MHC）区段内，其中还包括很多与免疫相关的重要基因。Matthias 等检测了 TNF 基因内的 a～d微卫星位点在头颈肿瘤患者中的多态性，研究发现：TNFb3 位点携带者患咽肿瘤的危险度上升（OR：2.2，$P=0.0006$）。TNF b3/b3 纯合子个体患咽肿瘤危险度上升更显著（OR：5.3，$P=0.004$）。声门上的肿瘤及多发性原发性肿瘤患者中多数 TNFa11 位点缺失。说明 TNF 微卫星位点所代表的位点缺失，与个体患咽鳞癌的危险度密切相关。

由于人群的家族、种族间的遗传多样性和复杂性，致确切的遗传多态性与头颈部肿瘤的关系的研究显出较大的难度，且结果缺乏足够的说服力，而大鼠与人类相似，有发生各种肿瘤的特性，且具有品系纯、影响因素易控制的优点，故 Kitano、Tanuma 等选择了大鼠进行遗传性状与舌癌发生的关系的研究。Kitano 等选择了 550 只易感型（DA）、抗型（WF）两种品系及其杂交品

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

系的大鼠，进行 1－氧化 4－硝基奎宁诱癌试验研究，结果发现：DA 型大鼠发生大于 5 毫米的浸润性舌癌的发生率为 93.6%，WF 型发生率仅为 4%，而两种品系的杂交后代 F1、F2 型的发生率分别为 47.5% 和 45.8%。F1、F2 型老鼠分别再与 DA、WF 型回交的后代，其发生率分别为 73.7% 和 24.6%。说明这两种大鼠的成瘤易感性分别由 2 个显性基因控制：1 个为肿瘤易感型，1 个为肿瘤抗型。Tanuma 对 DA、WF 品系大鼠的进一步研究发现，DA 型大鼠的易感性可能由一个半显性基因 Stc－1 决定，该基因位于 19 号染色体上与 D19Mit9 位点紧密连锁；WF 型大鼠的抗性可能由半显性基因 Rtc－1 决定，现已克隆定位在 D1Mit1、D1Mit3 位点间，与 D1Mit1 位点相距 20 cm 的距离处。对大鼠进行肿瘤易感基因的克隆研究，对发现人类的相关基因具有重要的意义。

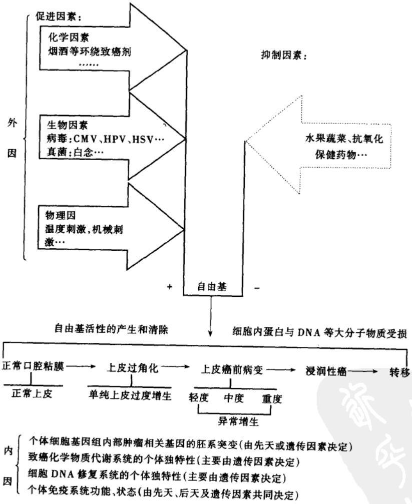


图 5－7　口腔癌前损害及口腔鳞癌的演变及相关因素示意图

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（二）头颈部肿瘤遗传易感性与 DNA 修复基因

已有的研究显示：个体间 DNA 修复能力的差异分布于很宽的范围内，散发性肿瘤患者的修复力为正常人群均值的 65%～80%，而干燥性皮肤综合征（XP）患者的核苷酸切除修复能力仅为正常人群均值的 1%～2%。可见 DNA 修复的个体差异与个体对致癌环境的抗性密切相关。

检测个体修复功能差异的方法，近年较流行的是 Lawrence 等建立的宿主细胞再活化（host cell reactivation，HCR）检测体系，检测个体外周血淋巴细胞的 DNA 修复功能（DNA repair capacity，DRC）。Wei、Janet 等，利用 HCR 检测法，对肺癌、皮肤癌、基底细胞癌等患者进行了检测，发现 DRC 可作为一项独立的患癌危险因素。Cheng 等对 55 例新诊断为头颈部肿瘤的患者与 61 例正常健康人进行对照研究，发现病例组的 DRC（8.6%）显著低于对照组（12.4%，$P<0.001$）。并发现中度及低度的 DRC 个体的危险度较正常 DRC 个体显著增高，其 OR 值分别为 2.17（95%CI＝0.74～6.39）和 4.27（95%CI＝1.45～12.5），也证实了 DRC 可作为一项独立的患头颈癌的危险因素。

Wei 等根据以往的研究，认为头颈癌与肺癌都是与环境致癌因素密切相关的肿瘤，由基因特异性决定的 DRC 与烟草相关肿瘤的患癌易感性密切相关。他在头颈部肿瘤易感性的另一项研究中，应用多重逆转录 PCR 检测（multiplex reverse transcription－PCR assay，MRT－PCR），研究个体外周血淋巴细胞的 DNA 错配修复基因家族的 5 个基因（hMSH2，hMLH1，hPMS1，hPMS2，和 hGTBP/hMSH6）的表达与患头颈癌危险性的关系。发现 78 例患者 DNA 错配修复基因的表达与患者肿瘤的病程、部位、烟酒暴露量无相关性，但 hMLH1，hPMS1 和 hGTBP/hMSH6 基因的平均表达量在病例组明显低于对照组（86 例），$P<0.05$。以正常组的均值为阈值，进行 OR 值计算后发现，低表达 hMLH1（OR：4.4，95%CI＝2.1～9.1）、hGTBP/hMSH6（OR：2.1，95%CI＝1.1～4.1）的个体的患癌危险度明显升高。

值得强调的是：错配修复基因的胚系突变可导致个体对家族性非息肉结肠癌高度易感性，而错配修复基因的体细胞突变则在很多肿瘤中都可观察到。错配修复基因的缺陷可导致基因组微卫星不稳定性。这在头颈部肿瘤组织细胞内也可观察到。这种现象可说明 DNA 修复系统在头颈部肿瘤的形成过程中发挥了作用。但对于遗传性的胚系突变引起的修复系统的差异还需其他的研究来加以认识。

Shen 等首先选择了 12 例正常个体，对其修复酶基因的基因多态性进行了测序研究，包括 3 个核苷酸切除修复基因 ERCC1、XPD 和 XPF；1 个参加双链断裂及重组修复的基因 XRCC3；1 个执行碱基切除修复和修复基因的放射诱导性损伤的基因 XRCCl。发现其中有 9 个不同的氨基酸替代突变。平均的突变频率为 0.17。其中有 6 个非保守的氨基酸突变发生在人和鼠共有的残基上，推测可能与个体的 DNA 修复能力的大小或染色体保真度有关。

对 DNA 修复系统的各种酶的人群基因多态性的研究，以及对头颈部肿瘤患者的相关多态性差异的研究，可能为找到特定的头颈肿瘤相关的修复酶多态性打开广阔的思路。

（三）致癌物质代谢相关酶的基因多态性

据估计，多达 90% 的人类癌症可能是由环境因素如吸烟、饮食和职业等因素引起。大多数环境致癌物必须经过代谢活化后才能发挥其生物学作用，同时，代谢也可能使致癌物失去活性。细胞癌变过程是一个非常复杂的过程，受到许多因素的影响。同样暴露于 1 种致癌物，是否发生癌症因人而异。已知一些药物或致癌物的代谢酶在人群中呈多态性分布，其活性在个

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

体间的差异相差数十倍至数百倍。个体对致癌物的吸收、分布、代谢，可直接影响对特定致癌物引起癌症的敏感性，这可能是造成不同人群癌症发病率差异的主要原因之一。

对致癌剂——DNA 加合物的检测发现，相同浓度的多环芳烃(polycyclic aromatic hydrocarbons, PAH)等致癌剂造成个体细胞内的 DNA 加合物浓度的变化，在个体间的差异达 30～50 倍；已知与致癌剂代谢相关的激活或解毒酶的基因存在人群多态性，目前已认识到与肿瘤易感性关系密切的代谢酶包括代谢Ⅰ期细胞色素 P450(cytochrome P450, CYP450)酶系统和代谢Ⅱ期酶。前者包括 CYP1A1、CYP1A2，可催化各种内源或外源性化合物的氧化代谢，在氧化过程中，可能产生各种电子亲和性的或致癌性的中间产物；与代谢Ⅰ期酶相反，代谢Ⅱ期酶包括 N－乙酰转移酶(N－acetyltransferase, NAT)谷胱甘肽硫基转移酶(glutathione S－transferase, GST)，它们的主要作用是使致癌性代谢物去氧化，生成可分泌的亲水性化合物。

1.CYP 酶系列　已经发现有 20 多种不同的基因编码的人类 CYP 酶，目前已知参与环境致癌物代谢的主要有：CYP1A1、CYP1A2、CYP2E1、CYP3A4，这些酶都存在基因型或表型的多态性。CYP1A1 参与代谢活化苯并(α)芘和其他多环芳烃类致癌物，而且可被这类致癌物所诱导。头颈部肿瘤相关方面的研究近年来才开始进行。Lazarus 等对 80 例口腔鳞癌患者的研究发现：组织 p53 突变率在 CYP1A1[val]/GSTM1 阳性基因型的患者中明显偏高(OR:6.0,95%CI＝1.2～29.7)。这说明口腔癌的转化过程与特定的致癌剂，以及个体先天特定的生物体内异物代谢酶的基因多态性密切相关。Park 等对 135 例患者进行口腔癌的年龄、性别、种族对照研究，结果发现，CYP1A1(ile:val)基因多态性在病例组中明显偏高，分别为 17.6%和 7.6%(OR:2.6, 95%CI＝1.2～5.7)。这些基因多态性差异在病例组中与患者的烟酒暴露量没有相关性。说明 CYP1A1 外显子 7 ile:val 位点的多态性的携带者与口腔癌的危险度直接相关。这种危险度与个体的烟酒习惯无关。

此外胞液中的 Ah 受体也参与了对 CYP 酶系统的诱导过程，其基因 Ah 也呈多态性，研究发现：具有对芳香烃(Ah)高亲和性的受体的个体，对二噁因、植物血凝素的致癌作用敏感，因为这些化合物可上调体内的 CYP1A1、CYP1A2 等基因的表达，从而增强了机体对这些致癌化合物的氧化作用。但在头颈部肿瘤方面的相关研究目前尚未见报道。

2.NAT 酶系列　N－乙酰转移酶是最先在肝脏中发现的在人群中呈多态性分布的代谢酶。NAT 与在香烟、食物，以及一些职业场所存在的芳香胺和杂环类胺类致癌物的代谢有关。该酶有两个同工酶，分别由 NAT1 和 NAT2 编码。NAT2 基因在编码区和非编码区的点突变，导致基因产物表达不良、不稳定或活性降低。从而出现快速型与慢速型两种表型。检测这两种表型最简便的方法，是测定受试者饮用咖啡后尿中咖啡因的代谢产物。NAT 与肿瘤易感性关系的报道最早见于膀胱癌和结肠癌的研究。Katoh 等对口腔鳞癌与 NAT 关系的研究，发现 NAT1 * 10 等位基因型与患口腔鳞癌的危险度密切相关(OR:3.72,95%CI＝1.56～8.90, $P<0.01$)。

3.GST 酶系列　GST 也属Ⅱ期酶系统，催化谷胱甘肽与各种亲电子的化合物(包括致癌物)反应，在多数情况下是一种解毒过程。因此，由于基因多态所决定的 GST 缺乏或活性低下，可能导致宿主对一些毒物和致癌物作用的敏感性增高。Matthias 等在对 380 例口腔、咽喉鳞癌患者及 180 例对照者的研究中，发现 GSTP1 AA 基因型在患者组的比例较低(OR:0.47, $P=0.003$)，用免疫组织化学的方法研究，发现正常鳞状上皮内除基底细胞层外，存在 GSTP1 亚单位的广泛表达，GSTP1 在喉部的纤维上皮内也呈阳性，且在相同个体肿瘤组织中表达也呈类

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

似情况。说明个体 GSTP1 基因的多态性可能与其上呼吸道、消化道肿瘤的发生率相关。

也有人对易控制影响因素的动物进行了类似的研究,以证实其与头颈部肿瘤的易感性的关系。Li 等对 4-硝基喹啉-1-氧化物(4-nitro-quinoline-1-oxide,4NQO)诱导的 WF(Wistar/Furth)和 DA(Dark-Agouti)两种基因型大鼠舌部癌演变模型及临床手术标本包括纤维息肉、重度异常增生、原位癌、鳞癌组织进行了 GST-P 抗原表达的研究。发现 WF 型大鼠较 DA 型大鼠对 4NQO 的诱癌作用敏感,其成瘤率和死亡率都较高。同时,显示 DA 型大鼠的癌前舌上皮内 GST-P 阳性灶(14.5 ± 6.5)较 WF 型大鼠明显偏高(5.5 ± 2.6, $P < 0.0001$);而对临床组织的研究发现,GST-Pi 抗原的表达在各类标本中差异较大,在重度异常增生、原位癌、鳞癌组织中核阳性和基底细胞的阳性表达,较轻到中度的异常增生组织中的表达高。可见 GST-P 虽在大鼠组织中的阳性表达可作为肿瘤转化标志,且它的表达及分布可作为高危病损的标志,但在临床中 GST-Pi 抗原标志的应用价值仍需进一步研究。结合前面提及的对 DA、WF 型大鼠的肿瘤易感性研究,可发现对肿瘤的易感性或抗性很可能是由体内多个易感相关基因环节所控制。

对代谢酶与患头颈癌的易感性关系的研究也存在反面观点。Ophuis 等对代谢Ⅰ期酶 CYP 和代谢Ⅱ期酶 GST 的基因多态性进行了 PCR 检测,选择了 185 例头颈鳞癌患者、78 例头颈良性病损患者及 207 例健康献血者,发现 GSTM1、GSTT1、CYP1A1 null 基因型在 3 组间没有差异。他认为这些基因多态性对个体患头颈鳞癌的易感性没有影响。

三、肿瘤易感性检测方法的应用

综上所述,在头颈部肿瘤的易感性研究领域,用于研究个体易感性的方法多种多样,包括:对相关基因位点多态性的研究、对关键相关基因在体内正常细胞内表达量的研究、对易感型及抗型的动物(大鼠)进行的质控较好的动物模型研究等。目前认识到的易感性相关因素也多种多样,因此方法学上也表现出多样性的特点。对相关基因位点多态性以及表达物的多态性的研究方法,正随着近年来分子生物学领域日新月异的发展,而不断推陈出新。本节暂时不作讨论,而重点介绍近年来在头颈肿瘤研究中应用得较多的 2 种方法和 1 种相关且简单的有较大应用前景的新方法。

(一)突变剂诱导的染色体畸变率与肿瘤易感性

研究突变剂诱导的染色体畸变率与肿瘤易感性关系的方法,是 80 年代发展的用于研究临床病例个体遗传易感性差异的方法。属于经典的遗传学研究方法。随着肿瘤分子流行病学肿瘤易感性研究的热点化,该方法近年来又重新得以在研究中广泛应用。1983 年 Hsu 提出假设:以往用于衡量 DNA 修复能力的染色体脆性不是一个全和无的现象,在人群中可能是呈现一种渐变的特点。在将细胞暴露于致癌剂后就能得到表现。他还提出对致突变剂敏感、在突变剂作用下易产生脆性的个体,可能具有患某些部位组织特异性肿瘤的内在高危因素。这些肿瘤包括与环境致癌因素密切相关的头颈癌、结肠癌、肺癌等。Hsu 等为了检测这种人群的差异性,提供患癌内在遗传危险因素的数据,建立了目前应用较为广泛的博莱霉素诱导的染色体畸变率敏感性试验。博莱霉素的作用机制是通过产生自由基作用的拟放射作用,与烟草的致突变作用类似。

其具体方法是将个体的外周血淋巴细胞(可分全血法 10 ml 和微血法 0.5 ml 两种方法)在促有丝分裂剂植物血凝素(phytohemagglutinin,PHA)作用下培养 72 小时。培养至 67 小时加入

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

博莱霉素共同培养5小时,此时染色体在博莱霉素的作用下产生很多断裂点。为计数断裂点,在培养结束前1~2小时加入秋水仙碱或秋水仙胺将细胞周期阻断于分裂中期。然后收获细胞,制作染色体片,计数50个分裂相细胞的染色体断裂数。诱导性染色体畸变率的相关因素很多,从方法学上就可看出与个体细胞对诱导剂的敏感性、细胞的修复功能都有直接的关系。

Hsu等在建立该方法的过程中,检验了不同人群的差异。选择了335例正常人群,发现其畸变率(平均每个细胞的染色体断裂数)范围在0.2~2.0间变化,其中有11%的个体畸变率高于0.8,22%的个体畸变率高于1.0。这一群个体被认为是对拟放射药物敏感的个体。在对83例结肠癌、77例头颈癌、71例肺癌,以及乳腺癌、脑瘤、视网膜母细胞瘤、Gardner's综合征患者的调查结果显示:在结肠癌、头颈癌、肺癌患者中,敏感个体所占的比例为40%~50%。对不直接与致癌环境接触的部位的肿瘤,如乳腺癌、脑瘤,在病例组与对照组间没有明显的关系。对家族性遗传性肿瘤,如视网膜母细胞瘤、Gardner's综合征也未发现明显差异性。而正常人群中的一群吸烟的老龄无癌个体,其染色体畸变率明显较平均水平偏低,56例个体中仅有1例(1.78%)被划为高敏个体。其研究中还发现:个体的畸变率检测具有较好的重复性,3对同卵双生者的畸变率极其相近,具有较高的同源性,而1对异卵双生者的畸变率差异较大。Cloos等以后的研究亦发现:在用化学预防药物N-乙酰半胱氨酸后患者的染色体畸变率没有明显改变。这在一定程度上证明,个体细胞的突变剂诱导性畸变率的检测值的个体间差异,具有某种遗传基础及稳定性。但确切的证据还需对大量的家系间进行对比研究来获得。

应用该法进行的肿瘤易感性研究,较其他方法早、多也较深入,因其检测的是与个体细胞敏感性及修复功能等多因素相关的一种遗传素质,所以未将其放在前一章节中讨论。Spitz综述了近年的基因易感性与肿瘤危险度的关系:个体间的对肿瘤致癌因素的易感性差异,是与致癌因素暴露量同样重要的危险因素,特别是头颈、上呼吸道、上消化道肿瘤的突变剂敏感性及细胞修复功能的个体差异,与个体是否发生肿瘤明显相关。Jacqueline等利用致突变剂诱导的染色体畸变率检测方法,对该类患者的肿瘤遗传易感性进行了研究,结果显示头颈部鳞癌患者中的畸变率显著高于单发的患者及正常对照。其他研究亦发现头颈部肿瘤患者的畸变率显著高于正常对照,且多发性原发或再发性原发的患者的畸变率更高,而烟酒、饮食、营养、防癌药物等对畸变率的高低没有影响。有趣的是几位学者的研究都发现:不同部位的头颈部肿瘤患者间畸变率存在明显差异。似乎表明遗传易感性的差异与肿瘤发生的部位存在关系。对于这种现象目前提出的假设是,部位性的差异可能是由于胚胎发育过程的不同,或不同部位的致癌因素暴露量的差异所引起。

(二)宿主细胞再活化性检测与肿瘤易感性

第二种较常见的检测方法,是前面已提及的检测宿主细胞DNA修复功能的宿主细胞再活化(host cell reactivation,HCR)检测方法。该方法的雏形始于70年代,其目的在于检测个体对放射线损伤进行修复的能力,但由于受到当时分子生物学发展的局限性,其方法复杂,灵敏度也成问题。90年代随着基因治疗的发展,Lawrence研究出了一种利用pCMVcat质粒致突变后导入人外周淋巴细胞,以检测个体修复能力的方法。由于pCMVcat质粒的即时快速高表达特性,以及同位素检测CAT酶的高敏度,该方法的灵敏度得到了实质性的提高,能用于检测个体间的微小差异。该法已在美国申请了国家专利(专利号为No.4975365)。Janet、Wei、Cheng等利用该方法对皮肤癌、肺癌、头颈部肿瘤患者进行检测,发现这类患者与正常人间的细胞修复能力存在显著性差异。结果提示检测HCR可作为监测患该类癌症的人群易感性的一项指标。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

值得提出的是，该方法并不代表细胞的全面修复功能，我们前面已提及细胞的修复系统分为几条路径，分别由各组复杂的蛋白系统协同完成。该方法检测的仅仅是细胞的核苷酸碱基剪切修复功能。因此它也具有检测因素单一、代表性独特的优点。

（三）单细胞凝胶电泳分析的研究应用

单细胞凝胶电泳分析（single cell gel electrophoresis，SCGE）又被形象地称为彗星检测（Comet assay），是一种快速、简便、直观、灵敏的检测哺乳类细胞内的DNA断裂情况的方法。其检测原理是：在碱性条件下DNA的单链断裂可在凝胶电泳系统的电泳迁移率上表现出来。将预检的1 000～500 000细胞与3种不同的胶共同制备成一个微小的3层凝胶系统，并进行电泳，电泳只需进行25分钟，然后用溴乙啶染色后在400倍放大体系下进行直接观察或摄影。细胞电泳后显示圆形的或彗星形拖尾的影像。拖尾的面积可进行直接观察对比或图像学测定（对于大样本量的研究），间接反映细胞中DNA的断裂程度。SCGE最早用于各种试剂对细胞DNA的损伤及修复的体内或体外试验，Green等开始利用个体外周血淋巴细胞标本，检测研究人群对氧化损伤、紫外线或电离辐射的敏感性。可见SCGE与突变剂诱导的染色体畸变率检测方法具有类似的机制和发展史，但目前还没有见到将其用于头颈部肿瘤易感性研究方面的报道。但可以看出SCGE较畸变率检测法具有周期短、所需细胞量小、检测值容易进行量化的优点，在肿瘤易感性研究领域具有广泛的应用前景。

随着人类基因组测序工程的进展及完成，对人群的基因多态性位点的认识以及相关的基因的蛋白功能的认识将成为下一期的重点任务，那时就可找到更多的更具特异性的易感基因相关位点。

（曾　昕　陈谦明）

参考文献

1 Trent RJ. Molecular Medicine: An Introductory Text. 2ed, New York: Churchill Livingstone, 1997

2 Wong DTW, Todd R, Tsuji T, *et al*. Molecular Biology of Human Oral Cancer. Cri Rev Oral Bio Med, 1996, 7(4): 319

3 Todd R, Donoff RB, Wong TW. The Molecular Biology of Oral Carcinogenesis: Toward a Tumor Progression Model. J Oral Maxillofac Surg, 1997, 55: 613

4 陈谦明，彭文珍，傅继梁等. p53基因抑制口腔粘膜鳞癌细胞株生物的实验观察. 中华医学杂志，1996，76(11):876

5 陈谦明，傅继梁，杨光华等. 口腔鳞癌发生中p53基因突变的聚合酶链反应－单链构象多态分析. 中华口腔医学杂志，1996，31(6):337

6 罗刚，陈谦明. 抑癌基因 $CDKN_2$ 与口腔粘膜癌前损害及鳞状细胞癌的相互关系. 国外医学口腔医学分册，1996，23(6):334

7 Mckaig RG, Baric RS, Olshan AF. Human Papillomavirus and Head and Neck Cancer: Epidemiology and Molecular Biology. Head & Neck, 1998, 20: 250

8 Roth JA, Cristiano RJ. Gene Therapy for Cancer. What Have We done and Where Are We Going. J Natl Cancer Inst, 1997, 88: 21－39

9 Clayman GL. Gene Therapy for Head and Neck Cancer. Head & Neck, 1995, 17: 535－541

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

10 Chen Q, Luo G, Li B, Samaranayack LP. Expression of p16 and CDK4 in Oral Premalignant Lesions and Oral Squamous Cell Carcinomas: A Semi - Quantitative Immunohistochemical Study, J Oral Pathol Med, 1999, 28: 158 - 164
11 Chen Q, Samaranayake LP, Zhen X, *et al*. Up - regulation of Fas Ligand and Down - regulation of Fas Expression in Oral Carcinogenesis. Oral Onclology, 1999, 35:548 - 553

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第六章　口腔疾病的基因治疗

自美国 NIH 于 1989 年批准第一项人类基因治疗计划后，不少的人类疾病基因治疗计划的研究成果投入到了实际应用之中，而更多的则在实验室积极的研究之中，期望在不久的将来投入到实际应用之中。可以说，基因治疗已成为治疗和预防人类疾病的一条新途径。

所谓基因治疗是指以正常和野生型的基因插入靶细胞的染色质基因组中，以替代置换致病或变异基因，从而恢复细胞应有的表型的一种治疗方法。基因治疗涉及目的基因、靶细胞、将目的基因引入靶细胞的转基因方法，以及对目的基因的表达调控等多方面的工作。虽然简单地说，基因治疗是通过介质将大量的基因导入体细胞，以产生期望的治疗效果的过程；但在实际操作中过程是十分复杂、艰难的。基因必须首先克隆、包装、转化进入期待的组织类型之中，此外，转入组织细胞的基因还必须能被诱导出所需要的功能性蛋白质。

第一节　基因治疗的基本流程

一、确定目的基因

首先确定目的基因在染色体上的定位，并将之克隆；然后弄清目的基因的生物学特性，并选择适宜大小的活性片段以应用于基因治疗。

二、重组载体

通过体外或体内的 DNA 重组技术，将目的基因活性片段重组于表达载体之中，然后采用限制性内切酶酶切、点杂交、Southern 点杂交等方法鉴定重组载体的生物学活性。

三、筛　选

通过物理、化学或生物方法，将携带目的基因的表达载体导入培养的靶细胞。经过一段时间的培养后，使目的蛋白充分表达。然后，通过 Northern 杂交，Western 杂交，ELISA，RIA，免疫沉淀等方法检测暂时性表达产物，并通过载体上的选择标记基因如 tk 基因或 neo 基因选择出稳定的高表达株，并加以扩增、提取、纯化。

四、导　入

根据基因治疗目的、载体的特性等，选择适宜的基因转导方法与转导途径，将重组载体导入细胞或组织器官。

五、疗效观察

载体导入靶细胞或组织器官后，要显示出疗效，尚需经过一段诱导时间，此阶段长短不一。因此，医患双方都应有足够的心理准备，同时密切观察可能出现的副作用如发热、局部炎症反

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

应等，并及时对症处理。

第二节 转基因体系

任何途径的基因治疗，都涉及到采用何种方法将外源性基因片段引入细胞的问题，即所谓的转基因体系。所有转基因的方法（表 6－1）从广义上来说都可以分为病毒性与非病毒性两类。后者还可细分为物理、化学方法等。

表 6－1 传递基因进入细胞方法

载体及大小	优点	缺点
逆转录病毒，10 kb	整合性 转导需要细胞分裂	低转导效率 需要包装细胞株 没有明确的靶细胞 竞争性复制 插入片段 9～12 kb 转导需要细胞分裂
腺病毒，35 kb	高转导活性 感染细胞类型多 感染不需要细胞分裂	无整合 需要包装细胞株 存在安全性、毒性、免疫原性问题 竞争性复制 没有明确的靶细胞 插入片段 4～5 kb
腺相关病毒，5 kb	整合性(?) 无病毒基因 感染不需要细胞分裂	无明确的靶细胞 需要包装细胞株 存在安全性问题 插入片段 5 kb
单纯疱疹病毒，152 kb	嗜神经性 大插入片段，40～50 kb 潜伏表达	无明确的靶细胞 需要包装细胞株 具有毒性
天花病毒，187 kb	大插入片段，25 kb	存在免疫原性、毒性和安全性问题 效率? 无明确靶细胞
天花病毒，260 kb	感染不需要细胞分裂 大插入片段，＞4 kb	存在免疫原性、毒性和安全性问题 效率? 无明确靶细胞
杆状病毒，80～230 kb	蛋白表达水平高 肝导向基因转导?	存在免疫原性、毒性和安全性问题 效率? 无明确的靶细胞

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

续表

载体及大小	优点	缺点
脂质体	完全系合成物 对核酸的大小和种类没有限制	无明确靶细胞 效率低
机械性应用	对核酸的大小无限制	无明确靶细胞 可能需要外科手术操作 效率低
蛋白质/DNA 复合物	对核酸的大小和种类没有限制 细胞特异定向	无整合 存在免疫原性、安全性和毒性问题体内效率低

在人类基因治疗计划中，最具应用前景的是病毒性转基因体系。几种基于病毒的转基因体系已成功地应用于转移遗传物质进入细胞或器官。然而，任何病毒都不可能不经修饰即可直接应用于基因治疗。总的来看，现在对病毒转基因体系的研究仍处于早期阶段。而且，还没有找到一种对大多数细胞类型的基因治疗都具有最高效率的转移体系。此外，如何加强这些载体中的插入子表达也是研究的重点。迄今为止，还没有研究者提出最佳的适用于口腔上皮性疾病如鳞状细胞癌基因治疗的转基因体系。

一、逆转录病毒

逆转录病毒是目前体外研究中最有效而且常用的病毒载体。一般的逆转录病毒的生活周期见图 6－1。简言之，逆转录病毒颗粒由核心、浆膜及胞膜组成。核心是两条相同的病毒 RNA 链及逆转录酶。病毒表面蛋白(SU)及转膜(TM)封套蛋白(Env)插入于浆膜之中。感染过程开始之初，SU 封套蛋白与宿主细胞表面受体特异性相互作用，封套蛋白即去除。病毒颗粒被宿主细胞摄取。释放出的病毒核心在逆转录酶的位置，以 tRNA 特异粘附引物(PBS)为引物合成双链 DNA。在此逆转录过程中，病毒 RNA 两端(U5 和 U3)的序列被复制并被置于新合成 DNA 的相反端，并由此形成两个完全相同的末端重复序列，称之为长末端重复序列(LTRs)，其结构为 U3－R－U5。在双链 DNA 合成过程中及合成完成后，病毒核酸酶/蛋白复合物重新进入细胞核。然后，与此复合物有关的病毒整合酶蛋白(integrase protein, IN)将病毒 DNA 插入宿主细胞 DNA。在此过程中，保持了原始病毒特有的 U3－R－U5－gag－pol－env－U3－R－U5 序列，并且，在宿主 DNA 中有许多位置病毒 DNA 都能够被整合。然后，整合 DNA 形成的病毒的基因组(即原病毒，provirus)被宿主细胞的转录机制从位于 LTR 区的病毒启动子处转录。原病毒至少携带有 3 个编码区(gag, pol 和 env)分别编码病毒的核心蛋白，酶活性(RT 和 IN)及封套蛋白。从 LTR 形成的转录单位形成病毒的 RNA，这些 RNA 用于翻译病毒蛋白及病毒颗粒基因组 RNA。病毒蛋白及 RNA 集聚成新的核心，此核心与宿主细胞膜上包含有新合成病毒封套蛋白的区域作用，形成新的病毒颗粒。新形成的病毒颗粒从感染细胞向外扩散，形成具有感染性的病毒颗粒，这些新合成的病毒再感染更多的宿主细胞。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

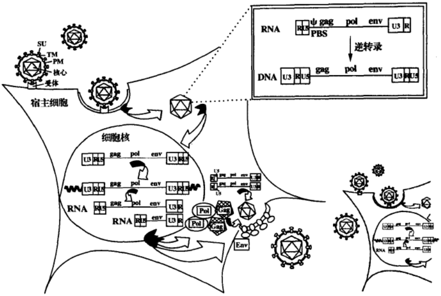


图 6－1　典型逆转录病毒的生活周期

逆转录病毒载体的构建是通过人工修饰使之失去结构基因 env 基因，从而不能复制形成新的、具有毒力的野生型病毒（图 6－2，图 6－3）。当构建重组逆转录病毒时，需要包装细胞（又称生产细胞）的辅助以产生全部结构蛋白。在包装过程中，通过选择系统的作用，保证只带有外源性基因的逆转录病毒 DNA 被包装进新的重组病毒颗粒中。包装细胞将重组的新病毒分泌到培养液中，将其收集起来便可用于基因转移。在应用中，可能根据不同的靶细胞，选择不同的包装细胞，以提高对靶细胞的转移率。用逆转录病毒转基因时，外源基因整合率很高，而且外源 DNA 与宿主 DNA 的相互干扰较小，有利于表达调控。但由于逆转录病毒只能感染有丝分裂的细胞，不能感染静止细胞，因此，使其用于体内基因转移受到限制，而仅用于体外研究。

对逆转录病毒转基因体系的研究始于莫氏鼠白血病病毒（Moloney murine leukaemia virus，MoMLV），这种病毒能够导致鼠类的恶性淋巴瘤和白血病，但通常认为对灵长类动物是非致病性的。这种病毒 RNA 基因组很小，由 3 个开放阅读框架 gag、pol、env 及包装序列组成。包装序列的两翼是一段长末端重复片段（LTR）。LTR 是下游基因的启动子，并有利于病毒整合进入感染细胞的染色体。

为了更好地应用于基因治疗，许多研究者都对 MoMLV 基因组进行了各种修饰（图 6－3）。这些修饰工作涉及到应用适合于靶细胞的基因及相应的启动子取代 gag、pol 及 env 基因，没有了这 3 组基因，病毒不能复制，但能够被特殊的细胞系所表达，并允许修饰病毒复制。对病毒株进行修饰的目的在于造成病毒基因组的人工缺失及其他的改变，以减少该载体在细胞内重

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

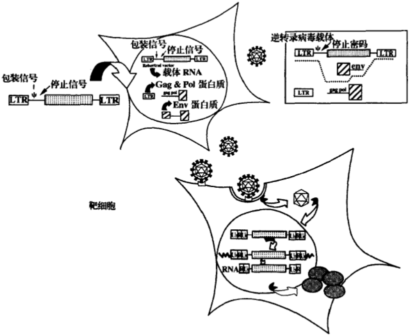


图 6－2　第三代逆转录病毒载体

最新近的安全性包装细胞株含两个独立重组体，一个表达 gag 和 pol 基因产物，第二个指导 env 蛋白表达

新组合并形成原有的具有传染性的逆转录病毒的可能性。

目前使用最多的的逆转录病毒转基因体系是 LNL6—— 一种 MoMLV 的修饰衍化体。另一种逆转录病毒载体的类型是所谓的双拷贝型。在此型载体中，目标基因被克隆到病毒的 3′LTR 端，因此，当病毒整合到靶细胞时，使用 tRNA polⅢ为启动子并产生两个拷贝，其结果是它们在被感染的细胞中表达大量的 RNA。数据表明，插入基因片段可以产生多达总量 5% 的 RNA，此生产量，已能成功进行抗病毒反义转录。

图 6－3 总结了几种常用的逆转录病毒载体。单纯性载体以 1 或 2 个异源性基因（垂直条形框及点框）取代 gag、pol 及 env 基因。两类基因都在包含于逆转录病毒的 LTR 中的 MLV 启动子的转录控制下。第一种基因全转录表达（相似于基因组的 gag－pol 转录），第二种基因采用剪切供体（SD）和剪切受体（SA）表达为剪切转录（spliced transcript，相似于 env 转录）。第二种载体中第二种基因（黑框）的表达可以被内在的异源性启动子控制，这种表达，可以是顺链方向，也可以是反义链方向。双拷贝逆转录病毒载体携带的基因，经常与载体的 3′LTR 区域的 U3 或 R 区的启动子相连接。在载体基因组的 RNA 被秉装为逆转录病毒颗粒并感染细胞后，通过逆转录方式合成双链 DNA 型的载体，并由此导致基因复制，以使第二个拷贝出现于 5′LTR。Procon 型载体携带有异源性的启动子（黑框），这种启动子常常来源于某种类型的靶细

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

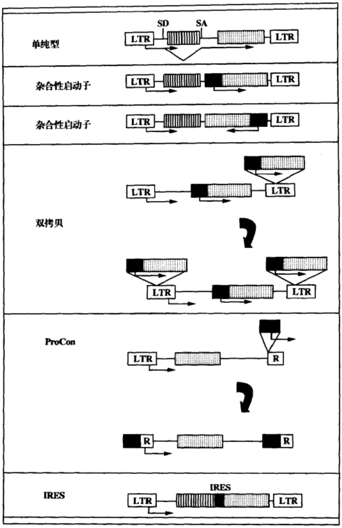


图 6-3 几种不同的逆转录载体

胞，以取代整个出现于 3′LTR 端的 U3。在感染和逆转录以后，异源性的逆转录病毒启动子被复制并被置于 5′LTR 端作为仅有的启动子，以指导逆转录性携带基因的表达。IRES 或双顺反子载体(bi - cistronic vectors)携带两个表达于 MLV 启动子的基因，此两个基因来源于同一转录体，内源性核糖进入位点可加速第二个基因的翻译。

从现在的资料看，还没有将逆转录病毒应用于将遗传物质转移进入口腔粘膜上皮细胞的研究。但已有研究显示，体外培养的角朊细胞能够被逆转录病毒所转染。然而，当采用修饰更

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

多的基因的病毒进行转染时，成功率却不足 5%。这些研究实际上说明修饰越多的病毒，转染能力越弱。

使用任何载体作为基因治疗的转基因体系时，都涉及到载体的安全性问题。采用转录病毒为载体时，病毒的 LTR 可能会带来副作用，因为此基因片段可以促进邻近上皮细胞的基因表达。另外的问题是靶细胞基因的干扰。已有研究者对逆转录病毒的安全问题进行了讨论，并计算了危险度。

二、腺病毒和腺相关病毒

腺病毒(图 6 - 4)属 DNA 病毒，能自然地感染人类粘膜上皮，因此，被认为是转移遗传物质进入这些组织的理想载体。用于基因治疗的此类病毒缺乏 E_1 和 E_3 基因，不能编码完整的结构蛋白，不能自主复制，必须在能编码 E_1 表达产物的 293 细胞中培养生长。相对于逆转录病毒等转移体系而言，腺病毒基因组包容量更大，提供的克隆位点更多，能应用于较大 DNA 片段的基因转移。此外，它能感染非复制期细胞，并使细胞的核内体失去完整性，直接将 DNA 转移进入到细胞浆之中。因此，可用于体内基因转移。而且，它对某些类型的细胞具有特殊的亲和力，有利于特异性局部基因治疗。

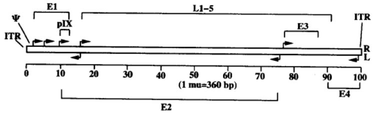


图 6 - 4　腺病毒基因组的线性模式图

中显示主要的转录区：早区(E1 ~ E4)，晚区(L1 ~ L5)；颠换末端重复序列(ITRs)及基因组包装信号(ψ)小结构蛋白 pIX 基因的位置。早基因的启动子用箭头表示并示转录方向。R：R 链，L：L 链，mu：图单位

图 6 - 5 显示的是在体内通过同源性重组方式构建 E_1^-/E_3^- 腺病毒载体。外源性基因最初被克隆到一些载体之中，其中最典型的载体是携带了腺病毒基因组左端达 16 个图单位的 pΔE_1sp1A 质粒。然后，形成的转移性质粒与 *Cla*Ⅰ$^-$ 消化的 Ad5 *dl* 327 DNA，或与另外的如像 pBHG11 一样的质粒一起被转染入包装细胞株之中。Ad5 *dl* 327 和 pBHG11 都具有 E_3 位点的缺失。pBHG11 同时具有 E_1 的缺失及包装信号 Ψ。由于 pBHG11 缺乏包装信号，当单独转染时，它是非感染性的。转移性质粒的 E_1 序列与 Ad5 *dl* 327 DNA 的 E_1 序列的同源性重组，准确地导致左旋腺病毒序列(the extreme left - hand adenoviral DNA sequences)及目标基因整合到 *dl*327 的序列之中。Ad5 *dl* 327 DNA 采用 *C*1*a*Ⅰ 预消化以降低其在包装细胞中的感染性。相似的，转移性质粒中的 E_1 序列与 pBHG11 的同源性重组，导致 pBHG11 中的 ori 序列及氨苄青霉素抗药性基因(Amp^R)被目标基因及功能性包装信号所取代。功能性包装信号的识别使重组病毒基因组被包裹。

Rosenfeld 等已使用腺病毒载体将 α - 1 - 抗胰蛋白酶(antitrypsin)转移到鼠呼吸道粘膜。这

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

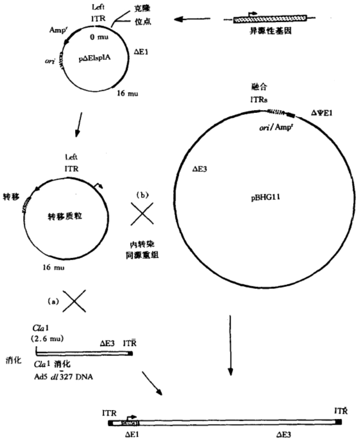


图 6-5　E_1 区含异源性基因的腺病毒重组过程

种方法对于治疗囊性纤维症具有潜在价值。因此,已有人类治疗试验获批准。另外的研究也显示,腺病毒通过静脉注射后也能将功能性基因转移到骨骼肌和心脏。对角朊细胞的研究发现,将腺病毒载体作皮下注射后,真皮和表皮细胞中都可以发现有其基因的表达,包括角朊细胞、皮脂腺、平滑肌细胞、成纤维细胞等。然而,在注射区域内同时出现了组织巨噬细胞,这有可能在一定程度上限制这类病毒作为体内基因转移体系。另外,由于此类病毒有在体内复制形成野生病毒的危险,故其应用前景尚在探索中。

腺相关病毒(AAV)广泛存在于人群中,且是非致病性的(图 6-6),且整合在 19 号染色体特异的、非要害性(non-essential)的位点上。其病毒基因组非常小,只具有两个开放阅读框架——rep 和 cep,以及另一基本序列 lip,基因组具有 3 个启动子——p5、p19、p40,侧翼系重复序列。由于其基因组小,它在细胞内复制前需要辅助病毒。AAV 能感染大多数靶细胞并将遗传信息带入这些细胞,而且也不需要这些细胞处于复制期。

Chatterjee 等采用 AAV 将 HIV 的反义序列转移进入细胞,使细胞获得了抵抗 HIV 的能力。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

AAV 的另一重要特性在于它的一段基因 rep 具有内源性抗肿瘤的效果。未修饰的 AAV 能抑制由乳头状瘤病毒导致的细胞转化,抑制单纯疱疹病毒的致突变性,增加细胞分化及降低人类子宫癌细胞在鼠体内的成瘤性。这些效果可以用任何抗肿瘤基因协同(synergistically),使 AAV 成为能特别应用于肿瘤如口腔癌治疗的载体。

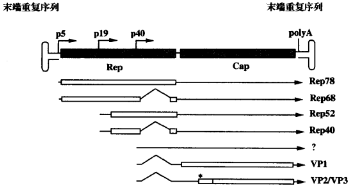


图 6-6　腺相关病毒基因组

病毒转录体显示于 AAV 基因图的下方。每一种 mRNA 的大小、不同 mRNA 合成的蛋白质都标示于右侧。图中同时标注了三种 AAV 的启动子及聚合腺苷化位点。VP2 合成于采用 ACG 为起始密码 VP3 的延伸端(星号表示)

三、单纯疱疹病毒

单纯疱疹病毒能感染其天然栖身体,并可以在实验室内产生较高的滴度。与逆转录病毒不同的是,它能感染非复制期的细胞。因此,Ⅰ型单纯疱疹病毒可能会是转移遗传物质进入口腔粘膜细胞的最好的载体。然而,单纯疱疹病毒是人类的致病因子,在它能被采用为载体前,必须进行许多必要的修饰工作。此病毒基因组大而复杂,但对有几个克隆位点已研究得较为清楚,而且,在其活性不受影响的前提下,许多病毒 DNA 片段可以被切去,此特性允许插入几个 kb 的遗传材料,甚至较其他载体插入的片段大得多。

Ho 和 Mocarski 的研究显示,用胸腺嘧啶激酶(thymidine kinase)取代病毒基因,并采用疱疹立即一早期启动子(herpes immediate - early)为调控因子,Ⅰ型 HSV 能将半乳糖苷酶(galactosidase)基因携带进入上皮,并获得较高的表达。上皮内 β-半乳糖苷酶的表达在注射后 4 小时开始出现,并在此后的 3 天内持续升高。

目前,以 HSV-1 为基础的载体被试用于转移基因进入脑组织治疗神经系统疾病,这是很合理的。因为 HSV 具有启动子,后者是病毒的潜伏相关基因。当病毒潜伏于神经组织时,此启动子是活动的。然而,多数情况下,HSV 并不栖身于上皮细胞内。假如基因治疗的目的是为了杀死上皮性肿瘤细胞,那么其不能在上皮中持续存在将不会是缺点,因为它对正常上皮细胞的干扰将会是较轻的。但对于需要病毒载体持续存在的治疗方案,其他载体可能会比HSV1为优。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

四、天花病毒

天花病毒被用作疫苗预防天花已数十年。此病毒基因组较大，并可以含大量不同的插入基因。从特性上来说，天花病毒经改造后能应用于基因治疗，并已有体内研究的报道证实皮下注射重组的天花病毒在皮肤上产生了表达，同时在肝、脾、肾、肺中也发现了其表达的迹象。这提示尽管是局部应用，此病毒载体也缺乏组织特异性。目前对此病毒的研究仍是发展新疫苗。

五、非病毒性基因转导方法

定位于表皮的裸 DNA 转导方法包括：皮内注射、使用高频振动纤维的针刺介导的基因转移、颗粒轰击转移(基因枪)。颗粒轰击转移方法涉及用 DAN 包裹惰性金或钨，然后利用高压将其转移到皮肤一定的深度。此外，局部使用的用阳离子脂质体形成复合体的 DNA 在定位于表皮的表达中是有效的。

直接裸 DNA 基因转移：角朊细胞吸收裸 DNA 的机制不清楚，此现象可能与半固定膜吸收有关。有证据显示质粒 DNA 不整合进入细胞基因组，而是处于非复制性的环状附加体(episomal)形式。

第三节　启动子

单纯的一组基因在细胞中并不能保证一定能表达。基因必须位于在此细胞中处于活跃状态的启动子附近。启动子即是指 DNA 链上一段指导 RNA 聚合酶结合并启动 mRNA 合成的 DNA 序列。选用或设计适当的强启动子，能使外源性基因在转基因细胞中高效表达。

启动子应满足下列基本要求：①组织特异性，治疗性的病毒载体如果不是感染靶细胞，克隆的目标基因不产生表达；②活性水平，不同的启动子在不同细胞类型中的表达程度具有差异；③表达持续性，对此目前了解最少。一些启动子处于活跃状态时间很短。例如在一项中枢神经系统的研究中，使用从 MoMLV 衍生的 LTR 作为启动子，产生了较组织特异性启动子更高的表达，但是，LTR 在 14 天后即关闭，而组织特异性启动子的活性却保持达 30 天。

对一些细胞来说，细胞特异性启动子是能够得到的。在不同成熟阶段的上皮细胞，有不同的细胞角蛋白基因表达。调控这些基因表达的启动子，或许是引导外源性基因于上皮组织表达的良好启动子。

在含有 HPV 的口腔癌中，HPV 基因组上游的调节区域(URR)是一个潜在的特异启动子。许多作用于 URR 的细胞因子导致位于下游的基因的表达。在宫颈癌细胞中的这类细胞因子现已基本明确，或许在口腔癌中也是相同的。在携带乳头状瘤病毒 DNA 的细胞中，病毒的 E_2 蛋白质能粘附于 URR 并且激活或抑制启动子，这取决于其他的细胞因子。然而，在 HPV 整合的肿瘤中，整合常常缩短 E_2 基因，使基因产物亦缩短，抑制启动子的功能丧失，并且仅仅是增强启动子的活性。已明确，URR 负责增强 E_2 功能的区域非常小，仅仅约有 12 个核苷酸左右。现已人工合成了基于此序列的启动子，它或许能够应用于 HPV 阳性口腔癌的基因治疗(表 6-2)。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

表 6-2 口腔癌组织基因治疗的潜在启动子

启动子	优点	缺点
CMV 早期启动子	高效	替代(constitutive) 无测试
MoMLV	广泛采用	替代 无测试
MMTV/RSV	显示有效	需要大剂量类固醇
SV40 早期启动子	广泛采用	替代 无测试
TRNA	非常高效	替代 无测试
HPV URR	非常特异	需要 HPV 的 E_2 蛋白
AAV-2 p40	出现于 AAV	无测试
角蛋白	组织特异性	无测试
ICP-4	显示有效	需要其他的 HSV 功能

注:高效是指启动子能驱使产生大量的表达;替代是指基因总是表达于所有的接受到该种基因的组织中;显示有效是指启动子在上皮细胞中能起作用,但不一定是口腔或肿瘤细胞所必需;未测试是指启动子未在口腔粘膜或相似的细胞中进行过测试

第四节 基因治疗的应用

一、肿瘤的基因治疗

肿瘤的基因治疗是基因治疗的主攻方向之一。包括以下几种基本类型:

(一)肿瘤的免疫基因治疗

将细胞因子基因导入可定位于肿瘤的细胞中,如肿瘤浸润淋巴细胞(TILs)和淋巴因子激活的杀伤细胞(LAKs)等,在肿瘤生长部位产生大量细胞因子,从而高效低毒地发挥抗肿瘤的作用。目前在基础研究和临床中用于转染的细胞因子有:IL-1、2、4、6、7,干扰素,集落刺激形成因子等。如果将上述细胞因子导入肿瘤细胞,即可改变肿瘤的免疫原性,使之成为免疫系统能够识别的靶细胞,使之既能杀伤经过改造的肿瘤细胞,又能杀伤体内的母瘤,此即俗称的肿瘤疫苗。

(二)反义技术抑制肿瘤基因功能

反义寡核苷酸技术,是人工合成与癌基因某些 DNA 和 RNA 序列互补的一段核苷酸,通过与相应序列结合而抑制过表达的癌基因的转录和翻译,从而抑制癌细胞的增殖活性。

(三)病毒导向酶解药物前体疗法

病毒导向酶解药物前体疗法指该基因编码的酶能活化无毒的药物前体,使之成为对自身细胞有毒的药物,从而杀伤该酶所在的细胞。如果将此基因转染肿瘤,则可选择性杀伤肿瘤细胞。在治疗肝癌时,利用肝癌细胞能表达与甲胎蛋白启动子偶联的单纯疱疹胸苷激酶。HSV-TK 可将基本无毒的 6-甲氧嘌呤阿拉伯糖转化为 AMP、ADP 和 ATP 的阿拉伯糖苷酸等细胞毒性物质,从而杀伤肝癌细胞。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

二、感染性疾病的基因治疗

(一)通过转基因诱导免疫反应

用逆转录病毒转染 HIV 膜蛋白结构基因到患者的成纤维细胞中,使之表达膜蛋白 gp－160,再植入患者体内,从而诱导抗 HIV 细胞毒性 T 淋巴细胞杀伤 HIV 感染细胞。

(二)干扰病毒复制

干扰病毒复制的方法较多,如将编码能切割 HIV 基因的核酶基因转入艾滋病患者的 CD_4 阳性淋巴细胞中,从而达到破坏 HIV 基因结构的目的;或合成寡核苷酸片段,与 HIV 的 gag 蛋白 mRNA 结合来抑制病毒复制。

早期,美国已批准的感染性疾病的基因治疗的临床研究几乎全是有关 AIDS,目前,感染性疾病的研究已不仅限于艾滋病,病毒性肝炎、流感和流行性出血热等疾病的实验性研究已取得实质性的进展。

(三)遗传病的基因治疗

在大量已经发现的遗传病中,腺苷酸脱氨酶缺乏症、囊性纤维变性的基因治疗的研究最为深入,且已取得成功。人类家族性高胆固醇血症的基因治疗也取得进展。我国使用表达Ⅳ因子的成纤维细胞对血友病 B 患者进行实验性治疗,已取得初步成果。

(四)神经系统疾病

现在认为,基因治疗可能是根治神经系统疾病的有效途径。如分别采用神经生长因子或酪氨酸羟化酶替代细胞移植,或直接注射载体于基底前脑或皮层,治疗早老性痴呆和帕金森病等,都取得了有效的进展。

(五)心血管系统疾病

动脉粥样硬化、血液凝固性过高、移植物血管病、心肌炎、先天性心脏病等,都有采用基因治疗取得效果的报道。

(六)伤口愈合

基因治疗也可应用于急性和慢性伤口愈合。严重烧伤和慢性溃疡已有采用含有角朊细胞的皮肤替代物治疗。这些皮肤替代物能够被遗传修饰所增强。已证明外源性胰岛素样生长因子能促进体外的角蛋白生长及体内的增殖,而没有改变表皮的分化程度。此外,体内研究已显示,皮肤中外源性表皮生长因子的表达,增加伤口愈合 20%。另一有兴趣的领域是调节 TGF β 水平以预防伤口愈合过程中瘢痕和纤维症的形成,这在美容外科领域也是一项引人注目的研究领域。

第五节　口腔疾病的基因治疗

一、口腔癌与癌前损害

(一)基因治疗的可能性

口腔鳞状细胞癌,由转化的角朊细胞组成,是口腔颌面部粘膜皮肤常见的恶性肿瘤。口腔医学中最先应用基因治疗的领域即是口腔颌面部肿瘤的治疗。由于口腔肿瘤手术易造成严重的颌面部畸形,故发展无创性的基因治疗法对其尤为重要。其他全身各部位肿瘤的基因治疗,

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

原则上都可用于口腔颌面部肿瘤的治疗。

Shillitoe 等最先将基因治疗结合口腔肿瘤的特点，用于口腔癌及癌前病变的治疗中。他们认为，对于直接针对肿瘤细胞内存在而正常细胞内不存在的关键特征物的治疗方法应该是最有效的。对口腔肿瘤而言，Shillitoe 选择口腔肿瘤中最常见的人类乳头状瘤病毒(HPV)作为治疗靶。HPV 是一种嗜上皮的 DNA 病毒，其中 16 型及 18 型是口腔粘膜肿瘤的高危型。HPV16 及 – 18 在体外可使正常角化上皮细胞永生化，转化为具有恶性表型的细胞。在此过程中，要求 HPV 的 E_6 和 E_7 基因高表达。一般认为，在口腔癌的发展中，HPV 的 E_6 和 E_7 基因产物是肿瘤发展的必要条件，配合创伤等环境刺激因素后可导致肿瘤的发生。如果在此进程中能够阻断 E_6 和 E_7 基因的表达，就能阻止肿瘤的发展进程。

Shillitoe 等的方法是构建一种专门针对 HPV16，18 的 E_6/E_7 基因的核酶来完成以上的目的。核酶是一种特殊的具有酶活性的 RNA 分子，它可以催化生化反应。Shillitoe 等设计的核酶专门针对 HPV18 的 mRNA 转录中的 3 个特征位点，从而彻底破坏 E_6/E_7 基因蛋白在细胞内的合成及表达。试验表明，这种酶在体外专门裂解 E_6/E_7 的 mRNA。最近 Shillitoe 将编码这种酶的 DNA 序列插入复制缺陷型的腺病毒载体获得成功，这为下一步，即将这种载体导入肿瘤靶细胞，并有效裂解 E_6/E_7 的 mRNA 的试验打下了基础。如果这些步骤都能够成功，可以想象，这种基因治疗的方法不仅将可能用于原位癌的治疗，还可能用于逆转传统方法治疗后的残余病变细胞及癌前病变中的非典型化异常增生细胞。

最近 O'Malley 等研究显示，通过腺病毒介导的基因转移，将单纯疱疹病毒的胸腺嘧啶激酶(thymidine kinase)自杀基因转移入肿瘤中，继之采用 gancyclovir 治疗，可使在裸鼠体内形成的人的头颈部肿瘤消失。相似的，腺病毒介导的野生型 p53 的转移，由于细胞凋亡的增强也导致了这些肿瘤的消失。体内采用的脂质体介导的单纯疱疹病毒的 TK/G 形式，也显示了肿瘤生长的抑制，但未得到消失的效果。

(二)基因治疗应用方案

假如合适的遗传缺陷的修正技术能够被应用，并能得到适当的病毒载体和启动子，那么口腔癌的基因治疗如何应用于患者呢？这里能够考虑的技术包括：

1. *直接注射进入肿瘤* 这可能应用于病毒载体或物理转移方法。

2. *应用于肿瘤的边界* 在外科手术时，于肿瘤边界应用基因治疗制剂，以消除任何残存的肿瘤细胞。

3. *栓塞* 注射治疗病毒或其他制剂进入供应肿瘤血液的动脉之中，如应用化疗制剂一样。

4. *漱口* 可能对使用治疗性病毒到口腔粘膜有效。最为重要的是必须感染基底细胞，而这一点则常常不容易做到，尤其是基因治疗病毒在组织中无复制能力时，更是如此，从而使制剂限制于应用的局部。

(三)适应证

1. *处理癌前损害* 许多白斑或红斑易向恶性转化，处理这些损害是一个很重要的临床问题。假如这些损害的遗传基础清楚了，基因治疗即可应用于预防这些损害的恶性转化。

2. *治疗已形成的肿瘤* 许多口腔癌可以通过外科方法切除，但若侵犯到致命区域或转移到多个部位时，外科手术即很困难。因此，对这些肿瘤采用一些新的治疗途径进行治疗是有益的。基因治疗甚至能够缩小肿瘤的大小，也使外科手术更容易一些。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

3.肿瘤复发或转移性原发性肿瘤的预防　原发性口腔癌发展为转移性肿瘤的危险性较高，口腔癌发展为转移性原发灶的可能性较其他肿瘤为高。假如这些患者外观正常的组织，能够选用适当的基因转移技术，转导预防性基因序列，也许能降低这些继发性肿瘤的可能性。这可能是最有可能应用于口腔癌方面的基因治疗。确实，化学预防制剂试验采用了相同的策略，并且显示，不少患者在相对较短的时间内能取得较好的有意义的数据。

二、白色念珠菌感染

（一）口腔念珠菌病与富组多肽

口腔念珠菌病目前已成为口腔粘膜的常见疾病，特别是艾滋病等免疫低下患者尤为常见。但抗真菌药物的发展远不及抗细菌药物的发展。而且报道有关对抗真菌药物耐药的念珠菌日益增多，特别是对氟康唑的耐药菌较多。研制的抗真菌药物长期服用也有一定的毒副作用。因此，一些科学家正在探索有效的生理性的抗真菌药物。在人类唾液中有许多非特异性抗菌物质，富组多肽（histatin）是其中重要的一种，有较强的抗念珠菌作用，即使对氟康唑耐药白色念珠菌，也有较强的杀灭作用（表 6－3）。自 1976 年从人唾液中分离到富组多肽以来，有关其命名、结构、功能、基因调控有一系列的深入的研究（详见第七章）。目前至少发现有 12 种富组多肽，人唾液中以富组多肽 1、3、5 为主。富组多肽仅存在于灵长类及人唾液中，在鼠、兔等实验动物中先天不存在富组多肽。1989 年的研究发现了产生富组多肽的基因 His－1 及 His－2。于是，学者们产生设想，能否通过基因疗法，使涎腺连续不断地分泌更多的富组多肽，以起到较好的控制感染的作用？

表 6－3　富组多肽对念珠菌的杀灭活性

蛋白浓度 (nmol/L)	活性（%）		
	histatin 1	histatin 3	histatin 5
54.00×10^{-3}	98.5 ± 0.5	99.5 ± 0.5	100.0 ± 0
27.00×10^{-3}	97.0 ± 0	99.0 ± 0	98.5 ± 0.5
13.50×10^{-3}	91.5 ± 0.5	97.5 ± 0.5	96.5 ± 0.5
6.75×10^{-3}	84.5 ± 1.5	96.0 ± 1.0	93.0 ± 1.0
3.38×10^{-3}	24.0 ± 3.0	71.5 ± 2.5	88.5 ± 0.5
1.69×10^{-3}	2.0 ± 2.0	5.5 ± 0.5	60.5 ± 9.5
0.84×10^{-3}	Nil	Nil	17.5 ± 0.5
0.42×10^{-3}	Nil	Nil	7.0 ± 3.0
0.21×10^{-3}	Nil	Nil	0.5 ± 0.5
0.10×10^{-3}	Nil	Nil	Nil

Nil：无活性

（二）富组多肽基因转移在体外人类细胞系中的表达

有关基因疗法的第一步，是将病毒介导的基因在涎腺组织中有效表达，证实体外能够产生富组多肽，并且产生的富组多肽仍具有抗念珠菌作用。Connell 等成功地将富组多肽 3 基因复制，缺陷性腺病毒为介导，CMV 作为启动子，体外转移至人肾上皮细胞（293 细胞）、大鼠颌下腺上皮细胞（SMIE）及人颌下腺细胞（HSG）。结果表明，细胞培养液中均有明显的富组多肽产生，

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

应用转基因培养液进行抗真菌试验，在120分钟内，可将90%的白色念珠菌杀灭，对耐氟康唑的白色念珠菌仍有杀灭作用。

（三）富组多肽基因转移治疗口腔念珠菌病

由于上述的研究结果令人鼓舞，目前美国国立卫生研究院(NIH)正在进行灵长类动物试验，并准备申报用于治疗艾滋病患者对氟康唑耐药者的口腔念珠菌感染。期望不久的将来能用于临床。

（四）富组多肽抗念珠菌作用机制的研究

虽然富组多肽抗念珠菌、抗细菌的作用有大量研究，但其作用机制尚不清楚。由于富组多肽有较强的抗念珠菌作用，并且对耐氟康唑的菌株有效，因此推测其与咪唑类的抗菌机制不同。最新研究表明，白色念珠菌的细胞膜可能存在富组多肽的特异受体，富组多肽进入白色念珠菌细胞内，使之内容物丢失而具有抗菌作用。富组多肽的浓度与其抑菌及杀菌作用成正比。

（五）转基因治疗口腔念珠菌感染的优势及存在的问题

1.*优势*　①富组多肽在唾液中不稳定，可很快被蛋白酶所分解，富组多肽转基因治疗可以一次注射基因，使涎腺连续不断分泌较多的富组多肽，起到有效的杀菌作用；②富组多肽为生理性抗菌物质，无毒副作用；③富组多肽为公认的强抗念珠菌物质，对其他抗真菌药耐药菌也有效。

2.*问题*　①由于富组多肽不稳定，给临床前试验及基础试验中检测富组多肽含量带来困难；②虽然应用的载体为非复制性病毒，基因整合对涎腺细胞及全身正常功能几乎无明显影响，但为大众接受仍需要时间。

三、涉及粘膜角化上皮细胞的基因治疗

粘膜角化上皮细胞的基因治疗法具有如下优势：①干细胞丰富、易识别、靶向性好，有利于提高基因导入的效率；②应用上皮组织细胞特异的内源性高效强启动子，有利于转入基因高水平的长期表达；③组织接近易操作，有利于体外法的植入及体内法的直接导入；④角质细胞的蛋白合成及分泌功能，有利于治疗局部或系统性疾病时的基因蛋白产物的生成及运送；⑤对基因修饰后的组织易进行监测及调节。例如Fenjves等利用上皮细胞所具有的旺盛蛋白合成功能及潜在分泌功能，构建能产生Apao E(调节胆固醇及脂蛋白代谢的重要蛋白质)的人类角化上皮细胞，将这些细胞培养出的上皮片种植到免疫缺陷的裸鼠体表，在裸鼠的循环血液中可检测到一定量的Apao E蛋白浓度。利用相同的原理，粘膜角化上皮可作为靶细胞导入各种新的基因并产生表达分泌。这种方法可用于如下治疗：供给体内循环系统缺少或不足的细胞因子或蛋白(如慢性粘膜皮肤念珠菌病)，局部补给治疗口腔粘膜疾病的生物活性剂等。此外，尚可利用角化上皮基因治疗法，治疗粘膜上皮系统的各种遗传性基因病。

四、涉及唾液腺的基因治疗

唾液腺因为其解剖和部位特点及其易接近性而成为基因治疗的优良靶组织。Mastrangeh等测试了利用复制缺陷型腺病毒载体，携带特殊蛋白基因转入大鼠的唾液腺的可能性。初期的体外实验表明，腺病毒载体可能感染腺上皮细胞；然后利用体内法，将载体逆行性导入唾液腺的导管口。结果显示，大鼠的主要唾液腺(腮腺、颌下腺、舌下腺)的腺泡上皮及导管上皮都可被腺病毒载体感染，组织学检测也显示腺泡上皮及导管上皮的细胞都可以作为基因导入法

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

的靶细胞。Mastrangeh 的实验还证明,运用同样的载体系统的体外法,也可成功地将外源性基因导入人的唇腺。

唾液腺的基因治疗,包括对唾液腺本身相关疾病的治疗,及利用唾液腺的合成分泌功能,将所需蛋白基因导入后在腺体内表达分泌入口腔,治疗口腔的相关疾病。前者的典型例子是口干症。引起口干症的两大主要原因包括免疫因素(如舍格林综合征)及医源性因素(如因头颈部肿瘤进行放疗,造成腺泡细胞的损伤)。唾液腺包括两大主要部分:腺泡部分细胞可分泌盐类物质,且具水通透性;导管部分细胞可吸收盐类物质,系水不透性。我们可将导管细胞转换为腺泡样细胞,使其具有分泌功能来改善口干症状。这也可被称为器官生物工程。

此外,还有人正在着手通过唾液腺途径,进行转基因预防牙周病的研究。其思路是,分离出牙周重要致病菌牙龈卟啉单胞菌的一种重要表面蛋白纤毛的基因,然后重组到腺病毒载体中并转入唾液腺,从而使得在腺体周围及唾液中产生纤毛。这些局部产生的纤毛如果能引起特异的 IgA 分泌,进而抑制牙龈卟啉单胞菌在牙周局部的聚集及参与菌斑的形成,就能达到预防牙周病的目的。

五、其他可开发的基因治疗

随着基因治疗及免疫学的发展,利用特殊致病菌的特征性即强免疫原性的蛋白基因的 DNA 核酸物质直接进行免疫,预防龋病、牙周病等感染性疾病的思路及研究也正在发展。此外,某些顽固性的亚型的龋病和牙周病,目前认为与一些遗传性的缺陷病有关,如某些青少年牙周炎与白细胞趋化功能障碍有关等。目前基因治疗血液系统的基因病已发展到了临床前期阶段,因此,对于这种白细胞趋化功能障碍的青少年牙周炎,如能在其血中的白系干细胞内导入纠正缺陷的基因,就有望缓解疾病的严重程度。

在粘膜病领域中,许多疾病都具有免疫异常现象及遗传倾向,如白塞病、复发性阿弗它溃疡、口腔扁平苔藓、慢性盘状红斑狼疮、寻常性天疱疮等。前面提及的角化上皮基因治疗法,也将给这些疾病的治疗带来方便。值得提及的是,随着人类基因组计划的进程,累及粘膜的这些多基因遗传病的遗传机制也将不断被认识清楚,在此基础上设计各种策略来对这些疾病进行基因治疗也将成为必然的趋势。

第六节　基因治疗潜在的危险

改良细胞基因的潜在能力伴随着大量可能的危险性。整合进入基因组的 DNA 可能会干扰原有的基因,这可能以不可预测的方式改变细胞的行为。相反,邻近整合位点的基因亦可能被激活,这可能再次导致不可预测的结果。病毒载体也有可能回复野生型的能力,在人群中复制和扩散,同时又携带有它们新的基因序列。当治疗性病毒以某些方式与野生系重组时,将没有办法重新识别出改良病毒。

除了这些生物学安全问题外,还有一些涉及人类基因组改造伦理方面的问题。以治疗疾病而进行的细胞基因组处理的矛盾变得较小了,但其他问题如来自于能够使生殖系细胞改造的能力、基因转移滥用的问题却增多了。这些问题将会随着基因治疗经验的积累而得以慢慢地解决。

(陈谦明)

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

参考文献

1 Lemoine NR and Cooper DN. Gene Therazpy. 1ed, Oxford: Bios Scientific Publishers, 1996,1

2 Garlick JA & Fenjves ES. Keratinocyte Gene Transfeer and Gene Therapy. Cri Rev Oral Bio Med, 1996,7(3): 204

3 Trent RJ. Molecular Medicine: An Introductory Text. 2ed, New York: Churchill Livingstone, 1997,整本书

4 Roth JA, Cristiano RJ. Gene Therapy for Cancer: What Have We Done and Where Are We Going. J Natl Cancer Inst, 1997,88: 21

5 Clayman GL, Gene Therapy for Head and Neck Cancer. Head & Neck 1995;17:535

6 Shillitoe EJ, Lapeyre JN and Adler – Storthz K. Gene Therapy – its Potential in the Management of Oral Cancer: Oral Oncol, Eur J Cancer, 1994,30 – 143

7 Trainer AH and Alexander MY. Gene Delivery to the Epidermis. Human Molecular Genetics, 1997,6(10): 1761

8 Breau RL and Clayman GL. Gene Therapy for Head and Neck Cancer. Current Opininon in Oncology, 1996,8: 227

9 Shillitoe EJ, Gene Therapy for Oral Cancer: Recent Progress in Research. Oral Oncology, 1998,34: 157

10 Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, *et al*. Histatins, A Novel Family of Histidine – rich Proteins in Human Parotid Secretion. J Bio Chem, 1988,263: 7472

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第七章　唾液蛋白分泌的分子调节

人类以及其他哺乳动物的唾液腺，可以产生和分泌一系列的糖基化和非糖基化的大分子物质。以功能而言，这些物质分为以下几类，即：细胞刺激活性物质(如神经生长因子、表皮生长因子)，抗酶活性或具有酶活性的物质(如 cystatin、蛋白酶、淀粉酶)，组织包被功能样物质(如粘蛋白、富脯蛋白 PRPs)，具有粘附细菌功能的物质(如粘蛋白、富谷蛋白 GRPs、富脯蛋白、富酪蛋白、富组蛋白、淀粉酶)，以及一些功能未知的分泌性蛋白(如腮腺分泌性蛋白 PSP)。表 7－1 显示了这些物质的功能和细胞定位。

表 7－1　唾液蛋白的功能

蛋白质	腺体来源	可能具有的功能	种属分布
淀粉酶	腮腺、颌下腺(浆液性腺泡)	消化高分子碳水化合物	人、大鼠、小鼠
激肽释放酶	腮腺、颌下腺(导管、颗粒状回旋管)	裂解丝氨酸蛋白酶	人、大鼠、小鼠
神经生长因子 表皮生长因子	颌下腺(颗粒状回旋管)	生长因子	人、大鼠、小鼠
血管紧张肽原酶(renin)	颌下腺(颗粒状回旋管)	将血管紧张素原裂解为血管紧张素；在血液的流动中发挥作用	人、大鼠、小鼠
Cystatins type 1	颌下腺	不明	人
Cystatins type 2	颌下腺(腺泡细胞)	抗蛋白酶	大鼠、人
富脯蛋白	腮腺、颌下腺(腺泡细胞)	钙凝固蛋白；参与获得性膜的形成、细菌的粘附与聚集	人、大鼠、小鼠
PSP	腮腺、颌下腺(腺泡细胞)	不明(可能参与淀粉酶的产生)	人、大鼠、小鼠
富谷蛋白	颌下腺(腺泡细胞)	组织包被	大鼠

大量资料显示，唾液蛋白的生物合成和分泌，是由交感神经系统调节的。刺激大鼠体内的 β－肾上腺素能受体，既可以改变鼠腮腺及颌下腺的形态，也可以改变由 mRNA 编码的大部分分泌性蛋白质的水平，这些蛋白质包括富脯蛋白、淀粉酶、腮腺分泌性蛋白、富谷蛋白、cystatins，翻译后的过程(如富谷蛋白的糖基化)也受到一定程度的影响。因此，哺乳动物的唾液腺不仅是研究细胞产生过程中神经递质和激素调节的良好模型，而且也被用作研究发育过程中组织内特定基因表达的分子机制。典型的实例为腮腺分化过程中 α－淀粉酶基因(Amy－1)和腮腺分泌性蛋白 mRNA 两个启动子的作用研究。

在本章中，我们将以哺乳动物为例，讨论①编码腮腺和颌下腺唾液蛋白的几种有代表性的基因的结构和组织；②唾液腺分化过程中及受胞外刺激时这些基因的激活过程；③唾液腺增殖

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

过程中原癌基因 C - fos 的表达及其结果。

第一节　典型的唾液腺基因的结构和表达

蛋白质合成的精确机制，对于一个细胞、一种组织，乃至整个机体正常行使其功能都非常关键。当一个细胞需要产生一种蛋白质时，它就会活化相应的编码特定氨基酸序列的基因。遗传信息被 DNA 序列携带着，通过转录和翻译表达出来。转录是指以双链 DNA 中的一条链合成单链 RNA 的过程。RNA 核苷酸序列转变为构成一种蛋白质的氨基酸序列的过程即为翻译。运用这一基本概念，我们探讨在唾液腺基因研究中常用的几种基因的特性。

一、激肽释放酶

激肽释放酶(kallikreins)是一类丝氨酸蛋白酶，它可裂解收缩原，产生血管活性多肽。这种酶广泛分布于机体的多种组织中(表 7 - 2)。许多其他的丝氨酸蛋白酶已被证实与组织激肽释放酶有密切的关系。啮齿动物的颌下腺中含有最高水平的类激肽释放酶。此蛋白酶家族的成员包括 tonin(来源于血管紧张素原，可裂解血管紧张素Ⅱ)、神经生长因子的亚单位(可产生 EGF C 末端的前体蛋白)，以及腺体内的激肽释放酶。

表 7 - 2　激肽释放酶的组织分布

组织	种属
肾脏	啮齿动物
肾皮质末梢管基底膜	人类
胰腺	啮齿动物
腺泡细胞	人类
颌下腺	啮齿动物
纹管，回旋管	人类
腮腺	啮齿动物
纹管	人类
胃肠粘膜	啮齿动物
前列腺	啮齿动物
	猪
腺垂体	啮齿动物
脑	啮齿动物
大脑上皮细胞，脑室	

激肽释放酶由多基因家族编码，小鼠有 24 个基因，大鼠有 10 到 17 个基因，在人类至少含有 4 种独特的基因。已经证实，小鼠的这组基因有高度的同源性，并且形成一个单体(couped)，中间间隔不到 5 kb，定位于 7^2 染色体上(表 7 - 3)。小鼠基因中有 10 个基因为假基因，其余 14 个基因具有编码功能性蛋白质的潜能。在大鼠和小鼠激肽释放酶基因组具高度保守性，外显子/内含子的结构非常相似，而且在一个染色体位点上。激肽释放酶基因连接区也具有保守性。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

表 7-3　啮齿动物分泌蛋白基因的染色体定位

基因	染色体	种属
激肽释放原酶	7	大鼠
淀粉酶	3	小鼠
富脯蛋白	8	小鼠
	8	人类
腮腺分泌蛋白	2	小鼠

已经证实,在大鼠的颌下腺至少有 6 条类激肽酶样 mRNA 表达。转录 PS 和 S2 分别编码真性激肽释放酶和 tonin。由大鼠 mRNA S1、S3、K1 和 P1 编码的蛋白的特性仍然未明,激肽释放酶的水平可通过免疫测定法而测得,其水平高低可受雄激素调节。

编码大鼠 tonin 和类激肽释放酶的丝氨酸蛋白酶的基因最近已经被确认,通过比较大鼠的 tonin 基因和类激肽释放酶基因发现,二者具有高度的同源性。这进一步证实了在激肽释放酶家族的不同成员中有密切的进化关系。

二、血管紧张肽酶原

多种具有同源性的血管紧张肽酶原(renin),在雄性小鼠的颌下腺中已被识别。这些蛋白酶分解血管紧张素而形成血管紧张素 I,后者在调节血压中发挥主要作用。这些酶被合成为不活跃的蛋白酶,其大多数过程已被确认。在雌性动物的组织内,睾酮可以刺激血管紧张肽酶原的合成,这提示,血管紧张肽酶原 mRNA 的转录受睾酮的调节。

与神经生长因子和表皮生长因子一样,血管紧张肽酶原也是在颌下腺内富含颗粒的管状细胞内合成的。在雄性鼠的颌下腺蛋白含量中,血管紧张肽酶原占 2% 以上,而雌性鼠中未发现有血管紧张肽酶原,因此人们推测,血管紧张肽酶原与雄性鼠特定的攻击性行为有关。

三、半胱氨酸蛋白酶抑制剂

半胱氨酸蛋白酶抑制物(cystatin)超家族由 3 个亚群组成。Ⅰ型 cystatin(stefin)在结构上是最简单的,不含二硫键和碳水化合物。迄今,在啮齿动物的唾液中还没有发现存在有Ⅰ型 cystatin。

Ⅱ型 cystatin 结构较为复杂,含有二硫化合物环,且由大约 115 个氨基酸组成。最近 Bedi 在鼠的颌下腺唾液中确定有Ⅱ型 cystatin。特别有趣的是,这种 cystatin 需要 β-肾上腺素能兴奋剂——异丙肾上腺素的诱导才能表达。过去由 Menaker 及其同事发现的 LM 蛋白质,在进行序列分析后发现,40%~50% 的序列与另外一种Ⅱ型 cystatin 相同,包括人类唾液腺 cystatin。在停用异丙肾上腺素处理 6 天后,仍有高水平的 cystatin mRNA 存在于腺体中,提示这种转录体的半衰期较长。最近有学者在大鼠颌下腺的腺泡细胞中定位了诱导性的 cystatin。但 cystatin 的诱导功能仍然不清楚。尽管炎症、热休克是否也可刺激这些蛋白酶抑制剂的表达尚不清楚,但对这些刺激的反应似乎代表了一种保护机制。

Ⅲ型 cystatins 在结构上最为复杂,被称之为激肽原。激肽原是多功能的蛋白质,既是有效的半胱氨酸蛋白酶抑制剂,又是作用于血管的肽(激肽)的生物合成前体。在许多生物系统中发挥作用,包括平滑肌和心血管系统。三种形式的激肽原由三组基因编码。高分子量型(HMW)和低分子量型(LMW)分别由同一基因(K 基因)编码,并且在 3′端具有相同的编码区。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

两个不同的基因编码第三种形式的激肽原,称之为 TⅠ 和 TⅡ 激肽原。大鼠 T 基因和 K 基因 mRNA 序列的同源性提示,T 基因是由 K 基因重复而形成。

通过免疫组织方法,已经在大鼠颌下腺的腺泡细胞和富含颗粒的管状细胞中定位了激肽原。但是在用松油脂诱导的急性炎性反应后,激肽原 mRNA 的水平仅仅在肝脏内有所增加。

四、富脯蛋白

唾液最基本的功能就是在口腔的硬组织和软组织中形成保护膜。这种组织保护功能是由唾液蛋白家族完成的,这些蛋白质有独特而简单的氨基酸成分,构成了两个重复单位。现有的资料提示,对唾液功能的发挥非常重要的是这些蛋白质的整体结构,而非特定的一段氨基酸序列。

最有特征性的是富脯蛋白(PRPs),其之所以这样命名是因为它的高脯氨酸含量(25% ~ 40%)。啮齿动物的富脯蛋白由组织特异的多基因家族编码。在小鼠和大鼠,可通过缓慢注射 β-肾上腺素能兴奋剂——异丙肾上腺素而使 PRP 表达。食物中的鞣酸可在鼠体内诱导这些蛋白质的表达,这提示 PRP 可以粘附并且清除口腔中的有害物质。进一步的研究发现,鞣酸对仓鼠是有害的,而且仓鼠不能在鞣酸的刺激下合成 PRP。

几种来自小鼠、大鼠及人类的 PRP 核苷酸序列已被确认。此外,编码小鼠、仓鼠 PRP 的基因序列和结构也已弄清。这些基因进化的前体在染色体上的位置如表 7-3 所示,5′端未被翻译的区域和在小鼠、大鼠及人类 PRP RNA 中是高度保守的多肽。据认为,这些保守序列可能代表了异丙肾上腺素介导的家族蛋白质诱导所必需的顺式成分。但是,潜在的顺式调节成分的功能分析,因缺乏适当的表达唾液特异表型的细胞系而受阻。

五、富谷蛋白

富谷蛋白(GRPs)是一个分泌性蛋白家族,在大鼠颌下腺唾液细胞中大量地表达。大鼠颌下腺中有 3% ~ 5% 的 RNA 参与富谷蛋白的转录。一半的蛋白质编码是由谷氨酸或谷氨酸残基所组成。其信号序列和部分 5′端未翻译的区域显示,与相应的大鼠肾上腺素诱导区域和小鼠富脯蛋白区域有 91% 的核苷酸具有同源性,提示这两个蛋白家族来源相同。最近的研究表明,在大鼠颌下腺,富谷蛋白的表达受到严格的限制。对牛、羊、猪、鼠的颌下腺的 RNA 进行研究,没有观察到 RNA 的转录。因此认为,富谷蛋白不同于富脯蛋白,它们在不同的种属中存在很大的差别。但二者之间也有很高的同源性。最近的研究表明,长期用异丙肾上腺素处理会影响富谷蛋白转录水平的稳定表达。

六、富酪蛋白

唾液中富酪蛋白(Statherin)的浓度为 2 ~ 6 μmol/L。其分子量为 5.38 kDa,等电点为4.22。Jensen 等利用高效液相色谱,已从颌下和(或)舌下腺唾液中分离出富酪蛋白的 3 种变种,即 SV1、SV2 和 SV3。该 3 种变种各约占总富酪蛋白的 30%。

富酪蛋白由 43 个氨基酸组成,其氨基酸组成中 Tyr、Pro、Glu 之和大于 50%。富酪蛋白、SV1、SV2 和 SV3 氨基酸序列见附图 7-1。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

Statherin

Asp – Ser – Ser – Glu – Glu – Lys – Phe – Leu – Arg – Arg – Ile – Gly – Arg – Phe – Gly – Tyr – Gly – Tyr – Gly – Pro – Tyr – Gln – Pro – Val – Pro – Glu – Gln – Pro – Leu – Tyr – Pro – Gln – Pro – Tyr – Gln – Pro – Gln – Tyr – Gln – Gln – Tyr – Thr – Phe

SV1

Asp – Ser – Ser – Gln – Gln – Lys – Phe – Leu – Arg – Arg – Ile – Gly – Arg – Phe – Gly – Tyr – Gly – Tyr – Gly – Pro – Tyr – Gln – Pro – Val – Pro – Glu – Glu – Pro – Leu – Tyr – Pro – Gln – Pro – Tyr – Gln – Pro – Gln – Tyr – Gln – Gln – Tyr – Thr

SV2

Asp – Ser – Ser – Glu – Glu – ---------Tyr – Gly – Tyr – Gly – Pro – Tyr – Gln – Pro – Val – Pro – Glu – Gln – Pro – leu – Tyr – Pro – Gln – Pro – Gln – Pro – Gln – Tyr – Gln – Gln – Tyr – Thr – Phe

SV3

Asp – Ser – Ser – Glu – Glu – ---------Tyr – Gly – Tyr – Gly – Pro – Tyr – Gln – Pro – Val – Pro – Glu – Gln – Pro – Leu – Tyr – Pro – Gln – Pro – Thr – Gln – Pro – Gln – Tyr – Gln – Gln – Tyr – Thr

图 7-1　富酪蛋白及其变种的氨基酸序列

－－－－－－－－示残基空缺，各氨基酸按最大相似性排列

从富酪蛋白的初级结构可以看出，在其氨基端（N 端），分子的 1/3 有较高的极性，包含了 3 个极性双肽。在其羧基端（C 端），分子的 2/3 是疏水性的，含有几个重复双肽。它们包括 4 个 – Glu – Pro – ，3 个 – Tyr – Gln – ，2 个 – Gly – Tyr – ，另外还含有 2 个 4 肽序列 – Pro – Tyr – Gln – Pro – 。

Jensen 等分析认为，富酪蛋白及其变种 SV2 是唾液腺体的两种不同基因的产物，而 SV1 和 SV2 则分别是富酪蛋白和 SV2 的蛋白分解产物。用胰蛋白酶消化富酪蛋白所得氨基端的1～6 个残基肽，包含了在整个富酪蛋白分子中存在的 6 个酸性氨基酸残基中的 5 个，即 1 个天门冬氨酸，2 个邻位的磷酸化的丝氨酸和 2 个谷氨酸残基。它们是抑制磷酸钙盐继发性沉淀的重要功能区段。

Sabatini 等认为，富酪蛋白由分布在人类的第 4 条染色体长臂上的第 11～13 位单基因（4q11～13）编码。它可以在腮腺、颌下腺的浆细胞内合成，亦可在鼻和支气管粘膜的浆细胞内合成。它在 Ven Ebner 腺体中的表达，可能与其调节唾液中的钙浓度的功能有关。

唾液中含有饱和甚至过饱和磷酸钙盐，但口腔内环境一直能维持稳定，一般无磷酸钙盐的沉积或晶体化，在很大程度上是富酪蛋白在起作用。而酸性富脯蛋白、中性富组蛋白和含半胱氨酸的蛋白质亦参与调节。富酪蛋白可与早期磷酸钙盐晶核表面结合，防止结晶核的继续生长，从而干扰了碱性磷酸钙的形成，防止自发性沉积。这种抑制作用使唾液中保持高浓度的钙和磷酸盐，造成一种富于磷酸钙的口腔环境。富酪蛋白也能吸附在羟磷灰石矿物质表面，参与牙面获得性膜的形成。该膜具有润滑作用，防止过度摩擦，同时能阻止酸的扩散，限制矿物质丢失。除此之外，富酪蛋白还有稳定磷酸二钙盐，阻止磷酸钙盐水解转换成更具碱性的磷酸钙

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

盐。因此，它能够维持唾液为一种过饱和的钙和磷酸盐溶液。这种含有过饱和钙和磷酸盐的唾液可以防止釉质脱矿，刺激脱矿的牙釉质再矿化，使新萌出的牙齿逐渐再矿化成熟。如果减少这种酸性肽的活性，则可能造成磷酸钙盐沉淀，使牙结石易于形成。颌下腺唾液含有高浓度及高饱和度磷酸钙，与腮腺分泌物相比较，颌下腺分泌物更具有形成牙结石的倾向。这一点与临床发现一致，即牙结石经常在下颌牙舌侧面和腺导管开口处相对应部位形成。

七、富组蛋白

富组蛋白是一族富含组氨酸的小分子阳离子多肽，存在于灵长类动物腮腺和颌下腺分泌物中。自 Azen 首次描述腺唾液碱性蛋白质的遗传多形性以来，其相应的蛋白质陆续被分离提纯。由于一些研究者各自用不同的分离程序和分析方法进行纯化，因而导致了同一成分的不同命名。

富组蛋白曾被称为“组蛋白”(histone)，腮腺碱性蛋白(parotid basic，PB)和后腮腺碱性蛋白(post－parotid basic，PPB)，富含组氨酸的碱性因子(histidine－rich basic factor)，富含组氨酸的“酸性肽”(histidine－rich acidic peptide，HRP)和富组蛋白(histatine)。目前的英文文献中一般把富组蛋白称为 histatins 或 HRPs。

迄今为止，Troxler 等已从腮腺和颌下腺唾液中分离出至少 12 种富组蛋白，分别命名为 histatin 1～12。该族蛋白质可分为中性和碱性两大类。其中 histatin 1～2 是中性富组蛋白，histatin 3～12 碱性富组蛋白族中，histatin 1、3 和 5 是其主要成分，这 3 种蛋白质之和占富组蛋白总含量的 85%～90%。

Histatin 1、3 和 5 的氨基酸序列分别见图 7－2，其同源性比较见图 7－3，其他特性比较详见表 7－4。从图和表中可见到 3 种 histatin 各含有 38、32 和 24 个氨基酸残基，且都在相同的残基位上含有 7 个组氨酸(histidine，His)。1 mol 的 histatin 1 含有 1 mol 的磷酸，而 histatin 3 和 5 则不含磷酸，这也是中性的 histatin 1 区别于碱性的 histatin 3 和 5 之所在。Histatin 1 N 端的 22 个残基中，除第 4(GlU)和第 11 精氨酸(arginine，Arg)不同外，其余的残基均与 histatin 3 和 5 相同。Histatin 1 和 3 C 端的 7 个残基亦相同。Histatin 3 缺乏 histatin 1 中的－Glu－Phe－Pro－Phe－Tyr－Gly－Asp－Tyr－Gly(残基 23～29)序列，而 histatin 1 则缺乏 histatin 3 中的－Gly－Tyr－Arg(残基 3～25)序列。Histatin5 和 histatin 3 N 端的 24 个残基完全相同。这种结构提示 histatin 1 和 3 来源于不同的结构基因，Histatin 5 则是 histatin 3 的蛋白分解产物。Histatin 2 与 histatin 1 C 端的 26 个残基相同。Histatin 4 与 hiatatin 3 C 端的 20 个残基亦相同，但在 C 端另有一个 Arg。Histatin 7～12 在形式上分别相当于 histatin 3 的 12～24，13～24，12～25，13～25，5～11 和 5～12 残基，提示 Histatin 7～12 为 histatin 3 的蛋白分解产物，但也可能来源于 histatin 5 和 6 的蛋白分解产物。

表 7－4 histatins 的特性比较

蛋白质	相对电泳特性	分子量(Da)	氨基酸残基数	磷酸(mol/mol)	基因
Histatin 1	慢	4929	38	1	1
Histatin 3	中	4063	32	0	2
Histatin 5	快	3037	24	0	2

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

histatin 1

Asp – Pse – His – Glu – Lys – Arg – His – His – Gly – Tyr – Arg – Arg – Lys – Phe – His – Glu – Lys – His – His – Ser – His – Arg – Glu – Phe – Pro – Phe – Tyr – Gly – Asp – Tyr – Gly – Ser – Asn – Tyr – Leu – Tyr – Asp – Asn

histatin 3

Asp – Ser – His – Ala – Lys – Arg – His – His – Gly – Tyr – Lys – Arg – Lys – Phe – His – Glu – Lys – His – His – Ser – His – Gly – Tyr – Arg – Ser – Asn – Tyr – Leu – Asp – Asn

histatin 5

Asp – Ser – His – Ala – Lys – Arg – His – His – Gly – Tyr – Lys – Arg – Lys – Phe – His – Glu – Lys – His – His – Ser – His – Arg – Gly – Tyr

图 7－2　几种 histatin 的氨基酸序列

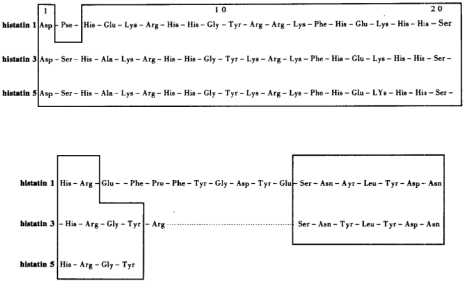


图 7－3　几种 histatin 的氨基酸序列同源性比较

Azen 首次报道美国黑人 PB 蛋白的多态性时，认为该蛋白由两个常染色体的显性等位基因编码，即 PB1 和 PB2。PB1 纯合子表现型在凝胶电泳中具有 4 种蛋白质，即 a、b、d 和 e；PB2 纯合子表现为 1 个主要的蛋白成分 c 和 1 个较小的蛋白成分 a，两者的迁移率均介于 b 和 d 之间。

Vanderspek 等研究了 histatins 基因在人染色体上的位置及其 mRNAs 的组织分布。发现 histatins 基因位于 4p13 上，且有 3 种 histatins 的 mRNA 在腮腺和颌下腺表达，而不存在于其他的研究组织中。提示 histatins 是唾液的特异性蛋白质。另外，他们还发现唾液富酪蛋白基因

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

位于 4p11 - q13 上。基于它们核苷酸序列部分相同，推测 Statherins 和 histatins 可能来源于共同的祖先基因(the same common ancestral gene)。

另有研究发现 histatins 由 2 个等位基因(PB 和 PPB)编码，且在人的腮腺和颌下腺中都有表达。Sabatini 等认为 histains 至少由 2 个密切相关的基因座位(HIS1 和 HIS2)编码。Histatin 1 和 3 分别是 HIS1 和 HIS2 等位基因的初级产物，histatin 4～6 来源于 histatin 3 的蛋白分解过程。另外，histatin 2 可能代表 histatin 1 的非磷酸化形式。Histatin 7 和 8 的来源尚不清楚，可能来源于 histatin 1 和 3 降解的混合肽。但也有学者认为 histatin 5 不是 histatin 3 的分解产物，而是由另一种不同的 mRNA 翻译的蛋白质。

对 histatin 的功能研究证实，它具有抗念珠菌感染的作用。而且，利用重组的 histatin，已经成功地在动物体内抑制了念珠菌的生长。专家们因而认为，通过转基因而表达的 histatin 可能是一种能够用于治疗念珠菌感染，特别是耐药念珠菌感染的良好制剂。

八、点蛋白

大鼠的点蛋白(spot proteins)1 分子量为 6.37 kDa，而且近交鼠点蛋白 1 的大小为 11.605 kDa。在一些家禽和鼠类有点蛋白 2 的表达，点蛋白 2 大小各不相同，最大可达 19.212 kDa。与富脯蛋白和富谷蛋白相同，点蛋白的序列由 3 个区域组成：富含羧基和酸性氨基酸的 N 末端区，一个包含 9 个氨基酸重复序列的中央区，和 1 个 C 末端区。通过观察大鼠和小鼠的mRNA及其编码蛋白发现，其存在着广泛的序列差异。研究还发现，分子的整体结构，而非氨基酸序列，是点蛋白发挥生物功能所必需。

九、α－淀粉酶

α－淀粉酶是一种含量丰富的唾液蛋白质。占唾液总蛋白的 5%，由腮腺和颌下腺的浆液性腺泡细胞分泌和产生，胰腺和肝脏中也有 α－淀粉酶的存在。

α－淀粉酶的基因结构已清楚。α－淀粉酶(Amy－1ᵃ)基因以单个拷贝出现在鼠的单倍体基因组中。Amy－1ᵃ 位于 3 号染色体上。基因被转录为 mRNA，除 5′末端不同外，它们具有完全相同的密码子。在小鼠的腮腺、胰腺和肝脏中没有编码序列。小鼠的淀粉酶基因有 2 个启动子，1 个基因产生 2 种组织特异性的淀粉酶 mRNA。基因的结构如图 7－4 所示。唾液mRNA 的前 50 个碱基由引导外显子 S 编码。外显子 S 位于外显子 15′位核酸区上游 7 399 bp。在肝脏，mRNA 的前 161 个碱基由引导外显子 L 编码，外显子 L 位于外显子 15′位核酸区上游的 4 500 bp 位。这些 mRNA 的唯一不同之处即在这些编码初始 5′端末翻译区的引导序列(S 和 L)的不同。淀粉酶编码区域开始于外显子 1 中的约 50 bp 处，并且是由外显子 1、外显子 2 及后面的外显子连接而构成。是什么信号导致了腮腺和肝脏的 mRNA 的拼接方式不同仍然不清。

大鼠 Amy－1ᵃ 基因结构与小鼠的相似。大鼠 Amy－1ᵃ 基因也包含有单独转录的 2 个启动子。大鼠基因中 2 个启动子之间的距离是 6 kb，而小鼠为 2.8 kb。此外，弱启动子(L)在大鼠只在肝细胞中较为活跃，在腮腺腺泡细胞发育的任何一个阶段都不活跃；而在小鼠，腮腺、肝脏和胰腺中它具有相似的功效。有学者对此提出了两种可能的解释。一种解释为大鼠腺细胞所含的特定抑制因子可以活化肝脏的启动子，另一种解释为小鼠唾液腺组织的活性是由于染色质末端结构的变化而引起的，而这种变化在大鼠的腮腺中没有发生或者以不同的方式发生。

胰淀粉酶由 Amy－2ᵃ 基因编码。Amy－2ᵃ 和 Amy－1ᵃ 除起始段 Amy－1ᵃ 的内含子外非常

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

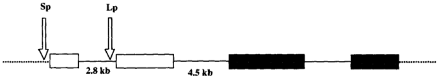


图 7-4 腮腺与肝脏 Amy-1ª 基因 mRNA 的差异

该图以 Amy-1ª 基因的一部分为例，说明腮腺和肝脏 mRNA 的差异。Sp 表示唾液腺启动子的领头序列（位于 50 bp 处），Lp 示肝脏启动子的引导序列（位于 161 bp 处）。■表示唾液腺和肝脏 mRNA 的一般序列

相似。Amy-1ª 起始段内含子序列被打乱，腮腺和肝脏 α-淀粉酶 mRNA 5′区未翻译。这两个基因序列具有同源性，这提示 Amy-2ª 和 Amy-1ª 是由同一个双倍体基因发育而来。Amy-2ª 位于鼠单倍体基因组 3 号染色体的一个双拷贝基因上。Amy-2ª 和 Amy-1ª 转录的 mRNA 在腮腺、肝脏、胰腺分别为 1.82 kb、1.90 kb 和 1.74 kb。这三个不同的 mRNA 可能是由于 5′末端诱导序列的不同所致。

十、腮腺分泌蛋白

唾液 α-淀粉酶在啮齿动物中的表达，与另外一种广泛存在于腮腺浆液性腺泡细胞中，被称之为腮腺分泌蛋白(PSP)的物质的表达相协调。据认为，Amy-1ª 基因和腮腺分泌蛋白基因按一定的比例各自直接产生淀粉酶和 PSP 蛋白。

PSP 为 1 个 8.3 kb 的单拷贝基因，它转录 1 kb mRNA，并且不仅在人类和啮齿动物的腮腺中占有优势，而且在颌下腺及舌下腺中也占有优势。基因位于 2 号染色体(表 7-3)，由 8 个内含子和 9 个外显子组成。由 PSP 基因编码的蛋白质是一种分泌性蛋白，这种蛋白中含有大量的 C-亮氨酸，分子量约为 25 kDa。PSP 在口腔中的作用目前尚不清楚。PSP 已被作为一种不同于 α-淀粉酶的较好的腮腺标记物。

第二节 唾液基因表达的调节

细胞内一种成熟的具有活性的蛋白质的合成相当复杂，包括以下步骤：①最初的转录物的合成；②转录的起始；③mRNA 向核外移动及在胞浆中的运输；④翻译；⑤修饰和蛋白质转换。蛋白质合成的速度与其 mRNA 合成的速度是一致的。调控 mRNA 合成的各种因素在蛋白质水平的调节中都可发挥重要作用。mRNA 的数量在发育时期以及受到各种刺激时可出现改变。

一、发育期唾液蛋白基因的调节

人们已对小鼠腮腺细胞不同发育期淀粉酶和 PSP 基因进行了研究。

小鼠 Amy-1ª 基因包含有 2 个启动子，在小鼠腮腺发育的不同时期分别被激活。从 L 启动子开始的转录在出生时即可观察到，并且逐渐增加，到第二周时达成年水平。由 S 启动子开始的转录在出生 1 周后才可观察到，在第二和第三周之间，其 mRNA 的水平增加 100 倍，在此期间，腮腺腺泡细胞增殖并且分化。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

α-淀粉酶的各种 mRNA 的生物合成的不同之处,仅仅在于5′端未翻译区的引导序列不同,这可能是这类蛋白质组织特异性各不相同的原因所在。例如,分化细胞控制 Amy-1ª 表达水平的一种方式,即是逆转录的起始位点及速率。

如果5′末端反映了转录启始的差异,那么一些初始的组织特异性转录因子,就能够以组织特异性方式增强α-淀粉酶的转录,这也就解释了为什么腮腺中(2%)和肝脏中(0.02%)α-淀粉酶 mRNA 的水平不同。Schilber 和 Sierra 两位学者已经提出,在小鼠腮腺腺细胞中,L 启动子(肝启动子)的早期激活,可能只是一般转录因子作用的结果,而唾液启动子的激活则是由腮腺特异因子所启动。Amy-1ª 基因在腮腺中的转录效率是肝脏中的30倍。肝脏中的启动子在腮腺中也很活跃。腮腺和肝脏中的启动子在其他组织如脑组织中都没有活性。因而,在其他组织的胞浆中也就不会存在有α-淀粉酶的 mRNA。

在啮齿动物的腮腺中,淀粉酶基因的表达与腮腺分泌蛋白基因的表达是协调一致的。在成年腮腺中这2种基因都呈现高水平的表达,分别为2%和10%,在出生10天时 mRNA 的表达仅为成年时的1/50。

从出生后的10~21天,mRNA 的表达呈现快速增加,到第21天时达到成年水平的一半。淀粉酶和 PSP mRNA 在腺泡细胞中被特有地表达,并且在不同的发育阶段,这些基因的表达呈渐进性的过程。然而,在腮腺发育阶段,当α-淀粉酶 mRNA 的稳定水平与 Amy-1 基因的表达呈现正比时,PSP 基因的表达不遵循这种方式。PSP 基因的转录在生后第12天达到成年的水平,而其 mRNA 的表达只有成年水平的1/50。这表明在其 mRNA 被累积之前,它的基因很可能已被积极地转录了。翻译的 mRNA 通常被转运到生后12天的动物及成年动物的胞浆中,但被转录的 PSP 基因的大小是不相同的。

这2种类型 mRNA 大小的不同,是因为生后12天的腮腺中的 PSP mRNA 有1个多聚腺苷酸尾(poly A)。Poly A 表明 mRNA 新近到达胞浆的数量,因为随着 mRNA 的成熟,其分子缩短。因为新生的 PSP 转录和输出在第12天是非常有效的,当其 mRNA 到达胞浆时,它的处理(缩短)可能依赖于在不同发育阶段的转换率。例如:在10~21天这个阶段,腮腺浆液细胞经历着粗面内质网的很大的精细调整,很有可能在生后10天这个阶段,PSP mRNA 到达所有浆液性细胞的胞浆中,但只有在那些分化良好的 RER 的浆液性细胞中累积起来。这解释了在12天时 PSP mRNA 达到最低量的原因。在相应 RER 不存在的情况下,通过何种细胞识别和更新编码分泌作用的蛋白质的 mRNA 的机制尚不清楚。因为这两种基因不完全相同,而只是有24 bp 片段在.PSP 和 Amy-1ª 5′-上游区及 CAAT-motif 区周围有60%的同源性,Amy-1ª 和 PSP 基因在发育过程中是否是受同一种机制调节尚不清楚。

鼠颌下腺的激肽释放酶的发生方式已被证实。在 SMG 中 PS(真正的激肽释放酶)mRNA 到生后10天时未发育,但在30~40天时达到成年水平。相反,血管紧张肽酶原 S2、S3、K1 和 P1 要到青春期才被发现。这也证实了它们是由雄激素调节的理论。

二、胞外刺激时唾液蛋白基因的调节

唾液分泌蛋白的合成常常受到一系列刺激的影响。蛋白质数量的变化通常反映了它们的 mRNA 的变化。例如,用睾酮或甲状腺素刺激颌下腺,会引起组织激肽释放酶的增加。激肽释放酶 mRNA 水平增高,说明激肽释放酶的合成增加,激肽释放酶是一种分子量为25~40 kDa糖蛋白,在各种组织中的分布如表7-2所列。由于分布不同,激肽释放酶在不同的组织中具有

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

不同的功能。这说明，这些酶的合成与其在不同的组织中所受的不同刺激有关。例如，睾酮、甲状腺素及氢化可的松可以增加雌性大鼠颌下腺中激肽释放酶的活性及免疫活性物质的含量，但是，其肾脏中这些物质的活性和含量并不增加。而且，睾酮所诱导的小鼠激肽释放酶基因的表达在纹状管和颗粒状管中是不同的。

体内用 β－肾上腺素慢性刺激，会导致腮腺和颌下腺的肥大和增生。这些组织的改变所伴随的更进一步的变化，是富脯蛋白、淀粉酶、腮腺分泌蛋白、富谷蛋白和 cystatin 2 基因表达的调节。在用异丙肾上腺素处理 10 天后，富脯蛋白 mRNA 水平会有较大的增高，并于第 3 天后达到最高水平。另一方面，在用异丙肾上腺素处理 2 天之后，淀粉酶水平比未处理组减少约 36%，并且处理期间维持在低水平。在用异丙肾上腺素处理期内，淀粉酶与富脯蛋白两者的基因表达是一致的。应用异丙肾上腺素处理鼠的细胞核的体外转录实验显示，异丙肾上腺素可以影响富脯蛋白、α－淀粉酶和腮腺分泌蛋白 mRNA 的水平及其转录。在颌下腺，异丙肾上腺素对 cystatin 2 基因的表达也有影响。cystatin 2 基因在胚胎 2 天及出生后 10 天的大鼠中均没有表达。在出生后 21 天仍没有 cystatin 2 的转录，在 28 天时达较高水平，在 32 天时急剧减少到几乎不能检测到。如果发育成熟的鼠用异丙肾上腺素处理 4 天，那么 cystatin mRNA 的水平会增高。

到目前为止，所有的研究都表明，用 β－肾上腺素刺激，几乎所有的唾液蛋白基因的mRNA 水平都会有所改变。这些基因的 mRNA 数量的改变都是通过转录来调节，并且由 cAMP 介导。基因转录可以被 cAMP 调节，也可被一些能增加 cAMP 的药物如异丙肾上腺素所调节。这些基因包括肾上腺髓质的酪氨酸羟化酶，肝脏中的 GTP 酶、生长抑素，以及抑制一些垂体激素释放的下丘脑肽。cAMP 通过一种保存的 cAMP 反应元件(CRE)介导这些基因的激素诱导，从而出现在它们的启动区。一种被称之为 CREB 的核蛋白已经显示出与鼠生长抑素基因及其调节基因转录的 CRE 具有高亲和力。体内研究表明，CREB 蛋白在 Ser－133 上的磷酸化是诱导转录的关键。

对鼠富脯蛋白基因 5′端的研究显示，启动子的结构与许多基因相类似。ATATAA 区定位从 AUG 起始段和 CAAT 未编码区自边缘区 97 bp 上游区 64 bp 处，此外，cAMP 基因调节序列位于 640 bp～622 bp 处。而且，小鼠和大鼠富脯蛋白基因 5′末端具有高度的同源性。腮腺分泌蛋白基因启动子结构也与其他基因相似，ATATAA 区和 CAAT 未编码区位于自转录起始端 82 bp 处。猿猴病毒 SV40 序列与多瘤病毒增强子序列具有同源性，这些序列所代表的意义目前仍然未知。可是，转染实验表明，腮腺分泌蛋白启动子需要有腮腺特定的转录因子，而非一般所知的因子。由于在发育期间及受 β－肾上腺素刺激时，腮腺分泌蛋白与淀粉酶基因表达相一致，人们就对这 2 种基因的 5′末端进行了比较。两者均在 5′末端上游区 －130 bp 处包含有一个 24 bp 的元件，在 CAAT 内编码区有 60% 的同源性。这样一种序列及与此序列相关的转录因子，以及由此而引发的对两种基因的调控，目前仍然未知。富脯蛋白、淀粉酶、腮腺分泌蛋白、富谷蛋白和 cystatin 2 基因的表达是否与异丙肾上腺素介导的唾液腺形态改变(增生/肥大)有关，目前亦不清楚。

最近的研究表明，巨噬细胞、甲状腺细胞、C6 胶质瘤细胞可以启动 1 组细胞即刻早期基因如原癌基因 c－fos 的表达。此为信号传导事件中的一部分，并与基因表达改变的细胞刺激相联系，导致细胞增殖、分化。因而，人们对大鼠唾液腺异丙肾上腺素诱导的 c－fos 基因的改变进行了研究。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

原癌基因 c－fos 与鼠骨肉瘤病毒基因 v－fos 基因的细胞是同源的。c－fos 在羊膜、卵黄囊、胎盘中具有较高的表达，且在妊娠中期、出生前、出生后、小鼠的肝脏中均有表达。在使细胞生长和增殖的环境中，都可以诱导 c－fos 的表达。在任何情况之下，这种诱导都是快速而且短暂的。c－fos mRNA 通常在 25～45 分钟达高峰，去除刺激后在 2 小时之内恢复至基础水平。fos 蛋白在 mRNA 出现后合成，并具有 2 小时的半衰期。

各种细胞外刺激（如佛波醇酯、EGF、PDGF、NGF、FGF、Ca^{2+}、钙调蛋白，及第二信使 cAMP）在不同组织和细胞中可诱导 c－fos 的表达。这似乎说明 c－fos 是受体－配体之间反应的一种直接产物。c－fos 影响细胞增殖、分化的机制可能是由控制这些过程的靶基因的转录速度所调节。因此，c－fos 蛋白是一种转录因子。转录因子，如前面所提到的 CREB，是基因启动区域具有高度特异性的小片段 DNA 序列。fos 蛋白复合物所辨认的序列是 TGAG/CTCA。首先，AP－1（活性蛋白－1）、fos 蛋白与 jun 蛋白形成稳定的复合物，jun 蛋白是 jun 基因家族的产物，并且与 AP－1 DNA 序列相类似。fos/jun 复合物是由两个含有氨基酸的 7 价重叠的 2 个螺旋区域相互作用所形成。

人们已经研究了体外用异丙肾上腺素刺激鼠腮腺腺泡细胞，或者用异丙肾上腺素口服后 c－fos 基因的表达。cDNA 探针运用、Northern 印迹分析可获得完整的鼠 c－fos cDNA 的克隆。对大鼠、小鼠、人类细胞中分离的基因进行 DNA 序列分析显示具有高度的一致性。此外，在 c－fos 基因启动区有 cAMP 反应元件存在，其氨基酸分析显示，cAMP 为依赖性激酶靶序列。c－fos 基因 mRNA 水平提示，在用异丙肾上腺素后 60 分钟，鼠 c－fos cDNA 在其腮腺腺泡细胞中被高度诱导，但在用异丙肾上腺素缓慢刺激时，在腮腺中不能检测到 c－fos 转录。这提示，尽管用 β－肾上腺素能受体刺激后早期可以诱导 c－fos 表达，但是，这种癌基因的表达与唾液腺细胞的增殖并不相关。用异丙肾上腺素和 cAMP 刺激后，30 分钟内 c－fos 的表达大大增加，但 c－fos 并不会即刻引起细胞的增殖或分化。总之，这些结果都说明，在发育期或受到细胞外刺激时，都会引发腮腺特异性基因的表达。在此过程中，腮腺特异性转录因子可能是必需的，它不是一种像 fos/jun 蛋白复合物的普通因子。fos/jun 复合物可能参与靶腮腺基因的调节，而靶腮腺基因又会影响组织特异性基因的转录，因而导致细胞的增殖和分化。这样一种假说可能会受到高度的怀疑，只有当能提供腮腺腺泡细胞初级培养时才能得到验证。

（武云霞）

参考文献

1 Kousvelari E. Tabak LA. Genetic Regulation of Salivary Proteins in Rodents. Cri Rev Oral Bio Med, 1991, 2(2): 139
2 Fergson DB. Aspects of oral molecular biology. 1ed, 1991
3 Oppenheim FG, Xu T, McMillian FM, *et al*. Histatins, A Novel Family of Histidine－rich Proteins in Human Parotid Secretion. J Bio Chem, 1988, 263: 7472

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第八章　细胞粘附分子的分子生物学

第一节　细胞粘附分子的基本特征

细胞粘附分子(cell adhesion molecules,CAM)是由细胞合成、存在于细胞表面或细胞外、介导细胞—细胞和细胞—基质之间相互作用的一大类分子的总称。其主要作用为维持组织的完整性和调节细胞的运动,促进细胞粘附、增殖、移动和浸润;调节大多数生理和病理过程,包括胚胎发育、伤口愈合、内环境稳定、炎症、骨吸收和肿瘤生长与转移等。根据 CAM 的结构和功能将其分为 6 大类:①整合素(integrins)家族;②选择素(selectins)家族;③免疫球蛋白超家族(immunoglobulin superfamily);④钙粘附素(cadherins)家族;⑤CD44;⑥细胞外基质分子。

一、整合素家族

Pierschbacher 和 Ruoslahti 于 1983 年首先描述了纤连蛋白(fibronectin)的细胞表面受体。1986 年,Tamkun 等在详细研究了鸟的纤连蛋白受体(含 α 亚单位和 β 亚单位的跨膜糖蛋白复合体)后,首先使用了"整合素"这一术语,意指该复合体是一个完整的膜结构,可能有组织细胞外基质和细胞骨架的作用。随后,有相似结构和功能特征的其他几个分子也被证实,于是 1987 年 Hynes 提出了"整合素家族"这一正式术语。整合素是一族由 α 链和 β 链通过非共价键连接的糖蛋白。α 亚单位的分子量介于 120～180 kDa 之间,β 亚单位的分子量介于 90～110 kDa之间。α 亚单位和 β 亚单位都是跨膜蛋白,具有疏水跨膜片段和与细胞骨架作用的胞浆结构域。

(一)分类

目前,已发现 16 个 α 亚单位和 8 个 β 亚单位,它们组合成至少 20 种异二聚体整合素。每个 α 亚单位可以和一个以上 β 亚单位结合,而且 α 链和 β 链存在选择性剪接,因而增加了这一家族的复杂性。Hynes 依据一个共同的 β 亚单位,把整合素家族分为整合素亚家族(表 8－1),每一亚家族内由独特的 α 亚单位决定配体特异性。这些亚家族包括细胞外基质受体的极晚期抗原(VLA)家族或 α β_1 亚家族、白细胞粘附分子的 α β_2 亚家族、α β_3 细胞粘附蛋白亚家族、α β_4 上皮整合素亚家族和 α β_D 果蝇位置特异抗原。β_1 亚家族成员一般粘附结缔组织大分子如纤连蛋白、层粘连蛋白和胶原蛋白;β_2 亚家族的 3 个成员是白细胞整合素,参与炎症和免疫反应中细胞—细胞间的相互作用;β_3 亚家族参与结合血管配体如纤维蛋白原,von Willebrand 因子,血小板反应蛋白及玻连蛋白。

(二)结构和功能

1.整合素的结构特征　每个整合素分子包含 1 个 β 亚单位和 1 个 α 亚单位,2 者之间为非共价键结合(图 8－1)。α 亚单位和 β 亚单位皆为 I 型跨膜糖蛋白,包含 1 个大的氨基末端细胞外延伸部分、1 个短的疏水跨膜序列和 1 个短的羧基末端胞内结构域。细胞外结构域依赖阳离子与细胞外基质成分或其他胞浆膜受体相互作用,细胞内结构域与细胞骨架中的肌动蛋白

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

和信号转导蛋白如蛋白激酶、钙结合蛋白相互作用。

表 8－1 哺乳动物整合素受体家族

β－亚单位	亚家族或来源	α－亚单位	配体	RGD* 敏感性
β_1	细胞外基质受体(最晚期抗原，VLA)	α_1	层粘连蛋白，Ⅰ和Ⅳ型胶原蛋白	－
		α_2	Ⅰ－Ⅳ型胶原蛋白，层粘连蛋白	－
		α_3	层粘连蛋白，Ⅰ和Ⅳ型胶原蛋白，纤连蛋白	－
		α_4	纤连蛋白(ⅢCS)，血管内皮细胞粘附分子－1	－
		α_5	纤连蛋白	＋
		α_6	层粘连蛋白	－
		?	肌腱蛋白	＋
β_2	LAF(Leu cams)	α_L(LFA－1)	细胞间粘附分子－1，细胞间粘附分子－2	－
		α_M(MAC－1)	C3bi，x 因子，纤维蛋白原	＋
		α_X(P150/95)	?	－
β_3	细胞粘附素	α_V	玻连蛋白，纤维蛋白原，骨桥蛋白，von Willebrand 因子，血小板反应蛋白	＋
		αⅡb(gp)	纤维蛋白原，von Willebrand 因子，玻连蛋白，纤连蛋白	＋
β_4	上皮，Schwann 细胞	α_6	层粘连蛋白?	
β_5 (s,x)	骨肉瘤	α_V	玻连蛋白	＋
B_n	成神经细胞瘤	α_V	Ⅰ型胶原蛋白，纤连蛋白	＋
β_p	淋巴细胞	α_4	?	?

* RGD：精－谷－天冬氨酸三肽序列

2.*整合素 α 亚单位的一般结构* α 亚单位由 1 个大的细胞外结构域、1 个跨膜序列和 1 个短的胞浆内结构域构成(图 8－1)。按是否有插入结构域或“Ⅰ”结构域把整合素 α 亚单位分为两种类型：包含“Ⅰ”结构域的 α 亚单位有 α_1(鼠)，α_2，LFA－1，Mac－1 和 p150；不含“Ⅰ”结构域的 α 亚单位有 α_4，α_5，α_v 和 α_{IIb}。“Ⅰ”结构域是 206 个氨基酸的插入序列，与Ⅵ型胶原蛋白、von Willebrand 因子、鸡软骨基质因子和补体因子 B、C_2 中的结构域具有同源性。因为含“Ⅰ”结构域的整合素通过该保守区域与各种细胞外基质分子发生作用，故“Ⅰ”结构域可能参与细胞外基质的组织和装配。不含“Ⅰ”结构域的 α 亚单位，在翻译时或翻译后裂解为二硫键连接的重链和轻链(图 8－1)。

目前研究的所有 α 亚单位均拥有纯化的金属结合结构域(图8－1)。钙可防止蛋白酶消

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

化，提示钙结合整合素可能诱导整合素三级结构产生构象变化。纯化的纤连蛋白受体在钙缺乏时不能与纤连蛋白包被的底物结合，提示整合素—配体的相互作用需要钙。但是，细胞粘附纤连蛋白包被的乳汁珠或可溶性纤连蛋白粘附细胞时不需要钙，因而，钙在整合素介导的粘附事件中的确切作用尚不完全清楚。镁离子可促进纤连蛋白与 $\alpha_5\beta_1$ 整合素紧密结合，这种特性被用来纯化整合素。

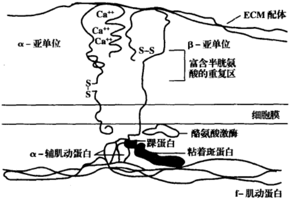


图 8－1　整合素结构和细胞粘附斑模型

整合素由 α 链和 β 链构成，α、β 链均有跨膜结构域。β 链的胞浆结构域与 f－肌动蛋白相互作用，踝蛋白和/或 α－辅肌动蛋白参与这种相互作用。整合素的 α 链决定配体的特异性。整合素结合细胞粘附蛋白需要二价阳离子的参与

3.整合素 β 亚单位的结构　如 α 亚单位一样，β 亚单位也由 1 个大的细胞外结构域，大约占该分子的 90%，1 个疏水的跨膜序列，和 1 个短的位于羧基末端的胞内结构域组成（图 8－1）。对精－丙－天冬－丝氨酸（RGDS）敏感的整合素（表 8－1）的 RGDS 结合区，位于 β 亚单位的氨基末端附近。每个 β 亚单位还含有 4 个富含半胱氨酸的重复序列，后者可影响分子三级结构和分子刚性。

β 亚单位的胞内结构域有 47 个氨基酸，其一级结构具有显著的种间保守性，人和鸡 β_1 亚单位的胞内结构域的一级结构具有 88% 的同源性。人 β_1 亚单位的胞内结构域含有 2 个酪氨酸残基，其中 1 个酪氨酸残基所在序列，与上皮生长因子（EGF）受体的胞浆结构域、neu 癌基因蛋白，和胰岛素受体中的酪氨酸激酶底物序列具有同源性。此酪氨酸残基被位于培养细胞和底物接触部位以及粘附部位附近的酪氨酸激酶磷酸化后，可调节 β_1 亚单位和胞浆分子的相互作用，通过整合素介导使细胞骨架进行有序排列。

整合素的基本功能是把细胞周围的细胞外分子或跨膜蛋白与细胞内骨架网连接起来（图 8－1），促进与细胞扩散和运动有关的细胞附着的变化，也使细胞外基质成分影响细胞内基因表达，从而影响细胞的增殖和分化。β 亚单位可能主要涉及构成细胞骨架的细胞内连接机制。

体外实验中，β 亚单位的胞浆尾部可和踝蛋白（talin）作用（图 8－1）。踝蛋白对粘着斑蛋白（vinculin）和肌动蛋白（actin）有中度亲和力，这 3 种分子都与局部接触有关，因而，踝蛋白和粘着斑蛋白，可能是连接整合素和肌动蛋白的中间分子（图 8－1）。但是，β_1 亚单位或 β_3 亚单位也可直接与辅肌动蛋白（α－actinin）相互作用。应用亲和色谱法，发现 α 辅肌动蛋白与 β_1 亚单位胞浆尾部的 752～798 残基相应的合成肽结合。α 辅肌动蛋白和肌动蛋白的整合素粘附位点不同，α 辅肌动蛋白的整合素粘附部位位于其蛋白水解片段内。α 辅肌动蛋白也粘附于从鸡砂囊、人血小板纯化的 GPⅡb/Ⅲa。α 辅肌动蛋白对完整的整合素异二聚体的亲和力，为对合成肽的亲和力 1/100，提示 α 亚单位可能对结合事件有一定影响。这些观察表明：整合素受体和 f

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

肌动蛋白的胞浆联系可能有两种机制，第一种机制可能涉及中间胞浆蛋白—踝蛋白和粘着斑蛋白，而第二种机制涉及整合素和 α 辅肌动蛋白之间的相互作用(图 8-1)。已发现局部接触部位存在其他蛋白，包括 fibulin、丝束蛋白(fimbrin)、张力蛋白(tensin)、200 kDa 的糖蛋白和 82 kDa 的糖蛋白，提示也可能存在其他的联系机制。

(三)特殊的整合素亚家族

1.β_1 整合素亚家族

(1)$\alpha_1\beta_1$ 整合素：用亲和层析法和特异性单克隆抗体干扰研究，发现人和大鼠的 $\alpha_1\beta_1$ 整合素的主要功能，是作为层粘连蛋白和胶原蛋白的受体。α_1 亚单位的单克隆抗体已用于抑制人特殊细胞株(JAR)结合层粘连蛋白包被底物的能力。Turner 等使用同样的方法，已抑制 PC12 附着于层粘连蛋白和胶原蛋白。$\alpha_1\beta_1$ 整合素可明显识别层粘连蛋白的 E1 片段，而非 E8 片段，E8 片段含有识别 $\alpha_3\beta_1$ 整合素和 $\alpha_6\beta_1$ 整合素的序列。应用层粘连蛋白亲和层析法，已从大鼠的神经组织纯化了 α 亚单位，并从其全长的 cDNA 推测出其序列。此亚单位包含 1 个插入结构域，与含有此结构域的其他 α 亚单位具有很大的同源性。α_1 亚单位与 α_2 亚单位很相似，40%的氨基酸具有同源性。目前相信 $\alpha_1\beta_1$ 整合素在神经的快速生长中起主要作用，因为此过程能被针对该受体的抗体抑制。神经生长因子(NGF)可诱导此受体表达增加 10 倍。

(2)$\alpha_2\beta_1$(VLA2)整合素：又名 gp Ⅰa/Ⅱa，是胶原蛋白的主要受体。WT-38 肺成纤维细胞、MC-63 骨肉瘤、HT-1080 纤维肉瘤、EJ、CCL-228 结肠癌、Hep G2 肝細胞瘤、IMR-90 肺成纤维细胞和 IDP T 细胞等细胞系可合成 $\alpha_2\beta_1$ 整合素，而在 RD 横纹肌肉瘤和 HPB-MLT T 细胞白血病细胞中，$\alpha_2\beta_1$ 整合素有少量表达。$\alpha_2\beta_1$ 整合素的主要配体为Ⅰ型和Ⅳ型胶原蛋白。$\alpha_2\beta_1$ 整合素不与明胶结合，对层粘连蛋白却有明显的亲和性，针对 $\alpha_2\beta_1$ 整合素的特异性单克隆抗体能抑制人黑色素瘤细胞系对层粘连蛋白的粘附，这种粘附不能被胶原酶消化所抑制，但成纤维细胞和血小板的 $\alpha_2\beta_1$ 整合素不结合层粘连蛋白，说明 $\alpha_2\beta_1$ 整合素存在功能不同的变异体。胶原蛋白和层粘连蛋白均有 RGD 序列，与纤连蛋白结合细胞的结构域中的 RGD 序列相似，但因为含 RGD 的肽不能有效地抑制配体—$\alpha_2\beta_1$ 整合素之间的特异作用，故此 RGD 序列可能不参与配体—$\alpha_2\beta_1$ 整合素之间的相互作用。从人骨肉瘤细胞中分离出的 3 种蛋白形成复合体，以 RGD 敏感方式粘附裸露的胶原蛋白，但此复合体与 $\alpha_2\beta_1$ 整合素是不同的。

α_2 亚单位的一级结构与其他 α 亚单位有 18%~25%的同源性，α_2 亚单位含有 191 个氨基酸的插入序列，该序列可能参与基质组装。血小板 $\alpha_2\beta_1$ 整合素的功能明显是镁依赖性的，钙离子可抑制其粘附功能，这与 α_2 亚单位的一级结构中含 3 个金属结合结构域的结构相一致。

(3)$\alpha_3\beta_1$(VLA3)整合素：$\alpha_3\beta_1$ 整合素对层粘连蛋白、Ⅰ型、Ⅳ型胶原蛋白和纤连蛋白有显著的亲和力。与 $\alpha_2\beta_1$ 整合素一样，配体—$\alpha_3\beta_1$ 整合素的关系对含 RGD 的肽不敏感。与其他含 β_1 亚单位的整合素相比，$\alpha_3\beta_1$ 整合素通常在各种转化细胞系中表达较高，此现象的意义并不清楚。但是，Rouslahti 和 Gioncotti 认为，$\alpha_3\beta_1$ 整合素可能是一定的转化细胞系中纤连蛋白—细胞相互作用的初级介质，$\alpha_3\beta_1$ 整合素对纤连蛋白的亲和力，较经典的纤连蛋白受体—$\alpha_5\beta_1$ 整合素(通常见于正常细胞)对其的亲和力小得多。实际上，尽管 $\alpha_3\beta_1$ 整合素在放射免疫检测中明显与纤连蛋白结合，但其在生理状态下并不结合完整的纤连蛋白。如果 Rouslahti 和 Gioncotti 二人的假设正确，那么转化细胞中低亲和力的 $\alpha_3\beta_1$ 整合素的优势表达，可解释这些细胞无力把

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

纤连蛋白集中在其表面上。

(4)$\alpha_4\beta_1$ 整合素：是独特的结合细胞外基质和细胞的受体，主要表达于有核的造血细胞，而在大多数其他类型粘附细胞中表达量很少，结构上具有独特性。与其他 α 亚单位不同，可以多种形式存在。α_4 亚单位分子的中间有一个裂解位点，裂解后可产生 70 kDa 和 80 kDa 两个片段。此裂解位点在不同类型细胞中是可变的。α_4 亚单位在 Ramos 淋巴母细胞样细胞中以 150 kDa的完整形式存在，在 U937 髓细胞样细胞中部分裂解产生 150 kDa、70 kDa 和 8 kDa 的混合形式，不同片段的功能尚不清楚。

$\alpha_4\beta_1$ 整合素有两种配体，即纤连蛋白和血管细胞粘附分子(VCAM－1)。含完整的或裂解的 α_4 亚单位的 $\alpha_4\beta_1$ 整合素的细胞与该两种不同的配体的结合完全一样。$\alpha_4\beta_1$ 整合素结合的区域位于纤连蛋白的羧基末端附近，以不依赖 RGD 的机制结合，识别序列为 LHGPEILDVPST，以纤连蛋白的Ⅲ型同源单位定位，称为ⅢCS。以细胞特异性方式选择性剪接的纤连蛋白 hnRNA 可能影响此特殊区域的一级结构。表达 $\alpha_4\beta_1$ 整合素而不表达 $\alpha_5\beta_1$ 整合素的 B 淋巴母细胞样细胞系不结合完整的纤连蛋白，但这些细胞可结合含 LHGPEILDVPST 识别序列的纤连蛋白片段，说明天然纤连蛋白分子上的识别位点是隐蔽的。纤连蛋白—$\alpha_4\beta_1$ 整合素结合的意义尚不清楚。

VCAM－1 是在细胞因子激活的内皮细胞上发现的细胞粘附分子。让内皮细胞暴露于白细胞介素－1β(IL－1β)或肿瘤坏死因子－α(TNF－α)中，2 小时以内 VCAM－1 mRNA 水平即增加，VCAM－1 表达增加与淋巴细胞同激活的内皮细胞结合增强相关。淋巴细胞上的 $\alpha_4\beta_1$ 整合素是 VCAM－1 的受体，用 α_4 cDNA 转染的 K－562 红白血病细胞表达 $\alpha_4\beta_1$ 整合素并与 VCAM－1 结合，这些细胞也可结合 VCAM－1 cDNA 转染的 COS 细胞或结合 TNF 活化的表达 VCAM－1 的人脐静脉内皮细胞。因而，VCAM－1—$\alpha_4\beta_1$ 整合素的相互作用在体内单核白细胞向炎症部位聚集中起重要作用，并可能参与肿瘤细胞浸润血管内皮，从而促进肿瘤转移。

(5)$\alpha_5\beta_1$ 整合素：见于多种类型细胞，是纤连蛋白的主要受体，表现高度的配体特异性，只以 RGDS 依赖方式结合纤连蛋白，亲和力为中度(解离常数：$8\times10^{-7}M$)。每个培养的幼仓鼠肾细胞上有 140 000～500 000 个 $\alpha_5\beta_1$ 整合素受体。硫酸肝素蛋白聚糖和神经节苷脂可能调节 $\alpha_5\beta_1$ 整合素介导的稳定结合。

哺乳动物的 α_5 亚单位是二硫键连接的复合体，包含翻译后裂解产生的 1 个 130 kDa 大肽段和 1 个 25 kDa 小肽段(见图 8－1)。尽管 α_5 亚单位的生物合成在 1～4 小时内完成，但由于 β_1 亚单位的寡糖侧链从 H－内糖苷酶敏感形式向 H－内糖苷酶耐受形式转化延迟，导致了 $\alpha_5\beta_1$ 整合素生物合成特别缓慢。脉冲示踪实验显示，$\alpha_5\beta_1$ 整合素的生物合成从头需要 20～24小时。尽管 $\alpha_5\beta_1$ 整合素生物合成慢，但由于细胞内有受体池，储备了细胞总 $\alpha_5\beta_1$ 整合素的 50%～99%，故胰蛋白酶处理的细胞在 30～60 分钟内即可粘附到纤连蛋白上。

$\alpha_5\beta_1$ 整合素的表达减少可能与细胞转化时获得锚着非依赖性有关。转染 α_5 cDNA 和 β_1 cDNA 的中国仓鼠转化卵细胞表达 $\alpha_5\beta_1$ 整合素，把更多的纤连蛋白沉淀入它们的细胞外基质。成纤维细胞装配含纤连蛋白的基质时需要 $\alpha_5\beta_1$ 整合素。而且，转染 α_5 cDNA 和 β_1 cDNA 的中国仓鼠卵细胞较对照卵细胞移动少，不能在软琼脂上生长，注射入裸鼠后不能生成肿瘤。用 MG－63 人骨肉瘤细胞的变异细胞系实验也观察到相似的结果，变异细胞系与其母细胞系不同之

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

处是其 $\alpha_5\beta_1$ 整合素表达增加 10 倍，表明 $\alpha_5\beta_1$ 整合素的异常表达可构成某些细胞恶性转化活性的基础。细胞外基质产生的信号和经整合素受体转导的信号，可以通过调节基因表达而影响表型的表达。碱性磷酸酶是成骨细胞表型的标志，针对 $\alpha_5\beta_1$ 整合素 α 或 β 亚单位的抗体，抑制 IL－1β 刺激的 MG－63 骨肉瘤细胞内的碱性磷酸酶活性，所以 $\alpha_5\beta_1$ 整合素的表达可能是 IL－1β 刺激 MG－63 骨肉瘤细胞表达成骨细胞表型的前提，$\alpha_5\beta_1$ 整合素可能调节成骨细胞的分化。$\alpha_5\beta_1$ 整合素也可能参与其他表型的表达，包括软骨细胞、脂肪细胞和成肌细胞。

(6)$\alpha_6\beta_1$ 整合素：见于血小板、巨噬细胞和神经细胞，是层粘连蛋白的受体。$\alpha_6\beta_1$ 整合素是巨噬细胞上层粘连蛋白的主要受体，介导活化的巨噬细胞对基底膜的粘附，开始血细胞外渗第一步。$\alpha_6\beta_1$ 整合素结合层粘连蛋白的 E8 片段，体外实验发现 E8 片段促进轴突快速生长，作为非神经细胞的粘附部位。肌动蛋白和 $\alpha_6\beta1$ 整合素不同时分布在未活化的巨噬细胞上，当巨噬细胞受乙酸肉豆寇酸盐大戟二萜醇(PMA，蛋白激酶 C 的协同剂)活化后，肌动蛋白和 $\alpha_6\beta_1$ 整合素才可同时分布于巨噬细胞上，活化的细胞粘附到层粘连蛋白底物上。此外，暴露于 PMA 后，α_6 亚单位含胞浆结构域的轻链序列磷酸化，提示 α_6 亚单位的磷酸化可诱导整合素—细胞骨架相互作用容许的整合素构象变化。α_6 亚单位还能与 β_4 亚单位形成异二聚体，$\alpha_6\beta_4$ 的配体尚不清楚，但已证实其位于上皮细胞和 Schwann 细胞上。

2.β_2 **整合素亚家族**　目前已鉴定 3 种 β_2 整合素即白细胞整合素：$\alpha_1\beta_2$ 整合素、$\alpha_2\beta_2$ 整合素和 $\alpha_3\beta_2$ 整合素，它们参与炎症和免疫反应中细胞间的相互作用。正常人皮肤中的朗格汉斯细胞表达以上 3 种 β_2 整合素。

(1)$\alpha_1\beta_2$ 整合素：是第一个被确定功能特征的白细胞整合素，除一些巨噬细胞外，所有的白细胞都可表达 $\alpha_1\beta_2$ 整合素，但在非红细胞生成细胞上未检测到 $\alpha_1\beta_2$ 整合素。$\alpha_1\beta_2$ 整合素的配体包括细胞间粘附分子－1(ICAM－1)，ICAM－2，和 ICAM－3。

(2)$\alpha_2\beta_2$ 整合素：由中性粒细胞、单核细胞、巨噬细胞、裸细胞(null 细胞)、T 淋巴细胞亚群和 B 淋巴细胞表达。

(3)$\alpha_3\beta_2$ 整合素：主要由单核细胞、巨噬细胞、null 细胞表达，在多形核白细胞和淋巴细胞亚群上表达密度较低。

3.β_3 **整合素亚家族**　$\alpha_v\beta_3$ 整合素是细胞粘附素整合素家族的一个成员，只与该家族已知的另一个成员即血小板整合素受体(名为Ⅱb/Ⅲa)分享共同的 β_3 亚单位。α_v 亚单位也可以与 2 种以上其他 β 亚单位结合，但这些整合素的功能目前尚不清楚。已发现的 $\alpha_v\beta_3$ 整合素的配体包括玻连蛋白、纤维蛋白原、von Willebrand 因子、血小板反应蛋白(thrombospondin)和骨桥蛋白(osteopontin，即骨唾液蛋白Ⅰ)。每种配体的一级结构中都含有 RGDS 序列，$\alpha_v\beta_3$ 整合素—配体相互作用可被含 RGDS 序列的合成肽抑制，钙和神经节苷脂 GD2 是 $\alpha_v\beta_3$ 整合素结合 RGD 序列所需要的。

大多数培养细胞能表达 $\alpha_v\beta_3$ 整合素，后者可介导细胞对塑料和玻璃表面的粘附。破骨细胞表达大量的 $\alpha_v\beta_3$ 整合素，伴随表达抗酒石酸盐的酸性磷酸酶和降钙素受体(二者皆为破骨细胞表型的标志)。降钙素可能是破骨细胞 $\alpha_v\beta_3$ 整合素的主要细胞外基质配体。体外实验中，$\alpha_v\beta_3$ 整合素的特异性单克隆抗体抑制骨吸收。

体外实验发现，$\alpha_v\beta_3$ 整合素结合降钙素序列，而且，含高密度 $\alpha_v\beta_3$ 整合素的细胞亦见于含

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

降钙素的肾和胎盘区。因而，骨形成和骨吸收可能与降钙素—$\alpha_v\beta_3$ 整合素（参与破骨细胞的归巢机制）偶联在一起。

也有证据表明 $\alpha_v\beta_3$ 整合素的表达可能参与破骨细胞表型的表达。在多核巨细胞形成前，$\alpha_v\beta_3$ 整合素即表达于前破骨细胞上。近来观察认为，$\alpha_v\beta_3$ 整合素可介导某些细胞—细胞相互作用，例如，$\alpha_v\beta_3$ 整合素的抗体具有阻断巨噬细胞吞噬正凋亡的中性粒细胞和淋巴细胞的能力。

（四）整合素—配体结合的调节

整合素与配体结合涉及到 α 和 β 链。配体的特异性主要由 α 链决定，α 链上有与配体结合相关的阳离子结合位点，与配体结合依赖于阳离子（Ca^{2+} 和 Mg^{2+}）的存在。细胞外基质配体包括胶原蛋白（collagen）、层粘连蛋白（laminin）、缰蛋白（kalinin）、纤连蛋白、玻连蛋白（vitronectin）、肌腱蛋白（tenascin）、触觉蛋白（entactins）、纤维蛋白原（fibrinogen）和 von Willebrand 因子。这些配体常常有特征性的氨基酸序列，最常见的是精—谷—天冬氨酸 3 肽序列（RGD）。尽管配体多种多样，但不同的整合素结合配体的方法相似，均识别基质蛋白的 RGD 序列。几个整合素可结合相同的配体，1 个整合素也可结合多种配体。但是，不同整合素识别相同配体可能介导不同的功能，此时整合素胞内结构域启动不同的信号途径。

细胞—细胞外基质相互作用受细胞内和细胞外的分子事件调节。位于局部接触部位附近的蛋白水解酶可降解细胞外基质的组成分子，这些酶包括纤维蛋白溶酶活化因子（尿激酶）、胶原蛋白酶和基质水解酶。一些影响细胞形态的转化病毒也诱导降解纤连蛋白的蛋白酶的表达。1 种名为需钙蛋白酶Ⅱ（calpain Ⅱ）的钙依赖蛋白酶，已经定位于局部接触的胞浆面附近，该酶可把踝蛋白裂解为两个片段，说明细胞内钙可能调节踝蛋白的水解，从而影响整合素介导的细胞外基质和细胞骨架间联系的完整性。因而，细胞内和细胞外的酶可改变整合素介导的结合事件。

如前所述，β 亚单位的胞浆尾有一个酪氨酸磷酸化位点。在正常细胞的局部接触区，发现含磷酸化酪氨酸的蛋白浓度较高。在从 Rous 肉瘤病毒转化细胞获得的整合素中，也发现磷酸化酪氨酸的水平升高。提示整合素受体的磷酸化可能调节整合素结合事件。

上调或下调整合素分子表达的制剂可影响整合素结合事件。各种生长因子可能分别调节不同整合素的表达。实际上，这些生长因子的生物活性是由整合素—配体的相互作用介导的。在几株细胞系中转化生长因子 - β(TGF - β)调节整合素的不同表达，在 PC12 嗜铬细胞瘤中，神经生长因子选择性增加 $\alpha_1\beta_1$ 整合素的表达，MG - 63 人骨肉瘤细胞经 1,25 - 二羟维生素 D_3 处理后，表达更多的纤连蛋白并结合更多的纤连蛋白，提供了维甲酸可影响整合素表达的间接证据。这些结果表明，生长因子通过影响整合素表达来调节细胞—细胞外基质间的相互作用。

整合素配体自身可影响整合素的表达。把培养的 MG - 63 细胞放置于浓度逐渐增加的 GRGDSP 合成肽中 6 个月，MG - 63 细胞产生 1 株变异细胞系。GRGDSP 是几种整合素的识别位点，变异的 MG - 63 细胞系纤连蛋白受体的表达增加 10 倍，此受体的表达与细胞形态的改变、碱性磷酸酶的表达、增殖率降低和细胞系形成肿瘤的能力降低有关。正常情况下，角质细胞不表达纤连蛋白受体，亦不粘附纤连蛋白包被的底物；但当角质细胞暴露于富含纤连蛋白的底物时，也表达纤连蛋白受体，这种机制允许角质细胞获得受体，以便它们能在富含纤连蛋白的结缔组织、暴露的伤口中移动，作为愈合过程的一部分。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（五）整合素介导的信号传导和细胞功能的控制

整合素不仅起粘附分子的作用，而且作为激活复杂的细胞内信号传导途径的受体。几种胞浆蛋白与整合素有明确关系，包括踝蛋白、α－辅肌动蛋白、粘着斑蛋白和浆膜蛋白 IAP－50 及大量的细胞浆激酶，因此，整合素是细胞外基质和细胞骨架间跨膜连接的桥梁。

整合素介导的细胞对细胞外基质蛋白的粘附可由外向内传递信号，引起整合素胞浆结构域的变化，从而产生多种后配体结合事件，如细胞分化、细胞移动、细胞增殖、局部粘附形成和诱导基因表达。整合素—配体相互作用引起的细胞内事件包括 Na^+/H^+ antiporter 的活化、酪氨酸蛋白的磷酸化、钙流的改变、转录因子的活化、桩蛋白（paxillin）的磷酸化、局部粘附激酶和其他几种胞浆蛋白的磷酸化。细胞粘附到纤连蛋白时成纤维细胞激酶活化，核转录因子磷酸化亦被激活。

相反地，在由内向外的信号传导中，基本的细胞信号通过整合素胞浆结构域调节细胞外结构域的配体结合性质。整合素的 α 链和 β 链的胞浆结构域中存在酪氨酸、丝氨酸和蛋氨酸残基，提示它们可能是酪氨酸和丝氨酸/蛋氨酸激酶的底物。整合素磷酸化的变化将影响其粘附功能和与细胞骨架蛋白的关系。

（六）皮肤和口腔粘膜中整合素的表达

复层鳞状上皮主要表达整合素 β_1 家族和 $\alpha_6\beta_4$ 及 $\alpha_v\beta_5$，这些整合素参与细胞—细胞和细胞—基质间的相互作用、细胞移动和细胞复层化，有助于终末分化（表 8－2）。

表 8－2　鳞状上皮表达的主要整合素

整合素	主要配体	粘附功能
$\alpha_2\beta_1$	Ⅰ和Ⅳ型胶原，层粘连蛋白	细胞—基质（同型）
$\alpha_3\beta_1$	层粘连蛋白 1 和 5，纤连蛋白，胶原	细胞—基质（同型）
$\alpha_5\beta_1$	纤连蛋白	细胞—基质
$\alpha_6\beta_4$	层粘连蛋白 1 和 5	半桥粒
$\alpha_v\beta_5$	玻连蛋白	细胞—基质
$\alpha_v\beta_6$	纤连蛋白，肌腱蛋白	细胞—基质

1．表皮中整合素的表达　正常人角质细胞表达 $\alpha_2\beta_1$、$\alpha_3\beta_1$、$\alpha_5\beta_1$、$\alpha_v\beta_5$、$\alpha_6\beta_4$ 及 $\alpha_v\beta_6$ 整合素。正常表皮以极性方式表达整合素 $\alpha_2\beta_1$、$\alpha_3\beta_1$、$\alpha_v\beta_5$、$\alpha_6\beta_4$，表达局限于基底细胞。$\alpha_6\beta_4$ 整合素为半桥粒的构成成分，局限于基底细胞的基底面，与层粘连蛋白结合。$\alpha_2\beta_1$ 整合素和 $\alpha_3\beta_1$ 整合素局限于细胞侧面，可能参与细胞—细胞间相互作用和细胞—基质间粘附。$\alpha_v\beta_5$ 表达于移行性生长的角质细胞的基底面。在培养的角质细胞中，β_4 的抗体阻止细胞—基质粘附，β_1 的抗体阻止侧方侵袭。

$\alpha_5\beta_1$ 整合素表达于培养的角质细胞，其 mRNA 的下调与终末分化有关，在培养的表皮细胞中加入纤连蛋白可阻断其终末分化，说明纤连蛋白受体的占位减少是终末分化的信号。体内 $\alpha_5\beta_1$ 整合素上调见于急性创伤和增殖性皮肤病，在这些状态下，整合素可表达于基底上层细胞。

TGF－β 存在于皮肤和粘膜创口内，它上调 $\alpha_5\beta_1$、$\alpha_v\beta_5$ 和 $\alpha_2\beta_1$ 的表达，诱导 $\alpha_v\beta_6$ 从头表达，刺激角质细胞向纤连蛋白和玻连蛋白移动。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

2.口腔粘膜中整合素的表达　口腔粘膜内 β_1 和 β_4 的表达与皮肤相似，α_2、α_3、α_6、β_1 和 β_4 亚单位呈高表达，而 α_5 和 α_v 亚单位的表达弱而且可变化。所有亚单位在基底层表达最强，在基底上层也有广泛表达，特别在口底和舌侧缘，反应了口腔上皮更新率增加。α_2、α_3、α_5、α_v 和 β_1 亚单位通常分布于细胞周围，而 $\alpha_6\beta_4$ 整合素则集中于基底细胞的基底面，$\alpha_v\beta_5$ 整合素表达于基底层、基底上层和棘细胞层。整合素在口腔内的不同部位表达相同。与皮肤一样，在创口愈合过程中，α_v 表达显著增加，$\alpha_v\beta_6$ 整合素从头表达。

3.角质细胞整合素的功能　其功能包括：①粘附细胞外基质；②介导细胞—细胞粘附；③调节上皮复层化；④调节终末分化；⑤控制细胞移动；⑥作为真正的信号受体。

（七）唾液腺细胞中的整合素和基质分子

整合素粘附分子与细胞外基质相互作用，在许多组织包括涎腺的分化中起关键作用。人唾液腺上皮细胞系提供了研究人唾液腺分化的良好模型。有人对颌下腺肿瘤中衍生出的唾液腺上皮细胞系观察发现，作为一个未分化群体生长，其表型与闰管细胞（intercalated cell）相似。但是，当人唾液腺细胞在 Matrigel（富含层粘蛋白和生长因子的细胞外基质制剂）上培养时，它们组织成了形态学上与导管和腺泡相似的结构，并且表达肌上皮和腺泡的分化标志，即波形蛋白、cystatin SN 和 α－淀粉酶。在Ⅰ型胶原蛋白凝胶上培养的人唾液腺细胞，其波形蛋白和 cystatin SN 的表达也上调；但在纤连蛋白上培养则不产生这种现象。细胞和细胞外基质成分间的粘附相互作用对此过程是必需的。加入相关的细胞外基质成分（层粘连蛋白或胶原蛋白），或整合素粘附分子（如 $\alpha_6\beta_1$）的抗体，在体外能阻断人唾液腺细胞的分化。

虽然提出了几种相关因素，例如，细胞粘附细胞外基质激活控制基因表达的信号传导分子，整合素介导对细胞外基质的粘附也使细胞对环境中的生长因子反应更强，可以控制细胞增殖和基因表达，但是粘附效应引起人唾液腺细胞分化的机制尚不明了。整合素介导的人唾液腺细胞对细胞外基质的粘附所诱导的信号，在启动细胞分化中起关键作用。

1.细胞骨架和信号分子组成的超分子复合体　细胞与固定的纤连蛋白与抗 β_1 整合素抗体之间的相互作用，促进细胞浆和跨膜蛋白的多成分在粘附部位形成大复合体。该复合体包括细胞骨架中的肌动蛋白和许多不同的信号传导分子，后者又包括各种 src 相关的信号传导分子和生长因子受体。粘附反应依赖于整合素介导和酪氨酸磷酸化。整合素与其抗体结合仅仅聚集张力素（tensin）和局部粘附激酶（FAK）。在缺乏酪氨酸磷酸化时，加入可溶性配体或用模拟配体的抗体，也可促进细胞骨架连接分子、α－辅肌动蛋白、踝蛋白（talin）和粘着斑蛋白（vinculin）的共凝集。整合素介导的粘附促进磷酸化链式反应，导致 MAP 激酶的激活和大量磷酸化的信号传导分子的聚集，这些分子包括 Ras、细胞外调节激酶（ERK）、JNK 和 src，还有几种酪氨酸激酶和它们的底物。

因此，整合素介导的凝集允许大量的信号传导链同时活化。已证实许多信号传导反应，包括钙流的改变、细胞浆 pH 值的变化、磷酸肌醇代谢的变化、磷脂酶活性的改变、蛋白质磷酸化的变化等，是细胞对细胞外基质粘附的结果。整合素介导的粘附激活多种蛋白激酶，包括 FAK、一些 MAP 激酶（特别是 ERK1 和 ERK2，它们与生长因子反应信号传导途径相连）和 Jun 激酶。此外，整合素激活和酪氨酸磷酸化也促进几种生长因子受体（如表皮生长因子受体和血小板衍生生长因子受体）的凝集。用生长因子处理人唾液腺细胞可激活 MAP 激酶，生长因子和粘附介导的信号传导之间有协同作用，这种协同作用在改变基因表达和介导分化中起关键

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

作用。

2.人唾液腺细胞与细胞外基质结合后细胞基因表达的变化　人唾液腺细胞在细胞外基质凝胶上培养3～5天，经历形态分化并表达分化标志（cystatin SN 和 α－淀粉酶）。细胞粘附细胞外基质激活了信号传导途径，从而介导调节分化的基因表达，所以，细胞—基质间的相互作用在促进人唾液腺细胞系的分化中起关键作用。人唾液腺细胞和细胞外基质间的粘附作用，主要由 β_1 整合素粘附分子介导。人唾液腺细胞粘附Ⅰ型胶原蛋白由 $\alpha_2\beta_1$ 整合素和 $\alpha_3\beta_1$ 整合素介导，粘附纤连蛋白由 $\alpha_5\beta_1$ 整合素介导。粘附细胞外基质是人唾液腺细胞基因表达变化所必需的，细胞外基质对人唾液腺细胞功能的影响由特殊的整合素粘附分子介导。

细胞和特殊的基质分子相互作用引起细胞大部分蛋白的生物合成发生改变。人唾液腺细胞对纤连蛋白和Ⅰ型胶原蛋白的粘附，迅速而显著地改变了细胞蛋白的生物合成，在纤连蛋白或Ⅰ型胶原蛋白凝胶上培养的人唾液腺细胞，用双向凝胶电泳检测，发现 ^{35}S－蛋氨酸标记的人唾液腺细胞的35%的蛋白表达上调或下调。人唾液腺细胞粘附纤连蛋白或Ⅰ型胶原蛋白的包被底物与粘附未包被底物相比，32种不同的基因，包括20种以前未证实的基因，在6小时内表达上调。粘附纤连蛋白或Ⅰ型胶原蛋白包被底物亦增强了5种转录因子的结合活性。因此，对Ⅰ型胶原蛋白或纤连蛋白的粘附在数小时内导致细胞生物合成发生变化。而且，基因表达的变化可能是整合素介导粘附的直接结果，因为用抗 β_1 整合素抗体模拟配体结合方式处理人唾液腺细胞，诱导了一些基因的表达。

在纤连蛋白或Ⅰ型胶原蛋白凝胶上培养人唾液腺细胞表达上调的基因已被分离、测序和分类。由整合素介导的与纤连蛋白或胶原蛋白相互作用诱导产生的大多数基因都是新基因，即它们不存在于基因库中，或它们是已表达序列标志（expressed sequence tags, EST）。这些基因包括：calnexin、90 kDa 的热休克蛋白、γ－肌动蛋白、核心蛋白聚糖（decorin）、S－腺苷甲硫氨酸脱羧酶、5种线粒体基因和2种不同的40 S核糖体蛋白基因。

整合素介导的对纤连蛋白的粘附，促进整合素粘附分子和许多信号传导分子及细胞骨架分子的凝集，形成超分子复合体。此超分子复合体的形成，在几分钟内促进几种不同的信号传导途径的活化，包括MAP激酶。而且，整合素介导的粘附也促进生长因子受体凝集入此超分子复合体内，在促进生长因子介导的信号活化中起重要作用。人唾液腺细胞粘附细胞外基质成分仅6小时，即可促进细胞生物合成的广泛改变，提示粘附在调节细胞生物合成中可能起重要作用。在人唾液腺细胞模型中，整合素介导的对细胞外基质的粘附对分化起关键作用。人唾液腺细胞模型系统，可用来检测粘附引起的变化在唾液腺分化过程的信号传导和基因表达中的作用。

二、选择素家族

最近，学者们认识到与植物血凝素结合的蛋白在白细胞和内皮细胞相互作用中的重要性。根据这些蛋白的选择性分布和氨基末端有植物血凝素结构域，把这些蛋白命名为选择素。

（一）选择素的结构

选择素由1个末端的植物血凝素结构域，1个上皮生长因子样结构域，补体结合结构域（包括约60个氨基酸），1个跨膜区和1个胞浆区组成。

（二）选择素的分类

目前已发现3种选择素，根据选择素原始来源细胞类型的不同，3种选择素分别被称为

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

L－选择素(来源于白细胞),P－选择素(来源于血小板),E－选择素(来源于内皮细胞)。选择素参与白细胞、血小板和内皮细胞之间的粘附。

1.L－选择素　L－选择素含2个补体结合结构域,是第一个被鉴定的选择素,亦是唯一存在于细胞表面的选择素。L－选择素由大多数白细胞包括一些淋巴细胞、多形核白细胞、单核细胞和其他的髓样细胞表达。幼稚T细胞表达高水平的L－选择素,但记忆T细胞的表达呈双峰分布。大鼠L－选择素的单克隆抗体,能阻断其体内淋巴细胞与外周淋巴结毛细血管后小静脉的高立方形内皮细胞结合,但在淋巴样组织如Peyers斑中却不能阻断粘附。因此,L－选择素被称为淋巴结的归巢受体。L－选择素还参与多形核白细胞进入炎症病损区。

2.P－选择素　P－选择素含9个补体结合结构域,存在于血小板的α颗粒和内皮细胞的Weibel－Palade体中。P－选择素仅在用凝血酶、组胺或佛波酯(phorbol ester)激活的细胞表面表达。

3.E－选择素　E－选择素含6个补体结合结构域,最初被认为是皮肤炎症内皮细胞上的活化抗原。这一选择素不仅由多形核白细胞浸润部位的内皮细胞表达,而且也由单核细胞浸润为主的组织的内皮细胞表达,如类风湿性关节炎。正常皮肤小血管和未受刺激的人脐静脉内皮细胞不表达E－选择素,然而,大多数较大血管(如主动脉)的内皮细胞都表达E－选择素。

(三)选择素的配体

3种选择素结合3组碳水化合物:①与Lewis X(sLe^x)和Lewis a(sLe^a)有关的寡糖;②磷酸化单糖和磷酸化多糖;③磺化多糖。E－选择素和P－选择素两者都结合sialyl Lewis X, L－选择素给E－选择素和P－选择素提呈sLe^x。

此外,在人的血浆中检测到E－选择素、P－选择素和L－选择素的循环形式。P－选择素由血小板分泌,在血浆中的水平较高(1.6 ng/L),能结合中性粒细胞。可溶型选择素不表达EGF结构域上的抗原决定簇,所以选择素的可溶型和膜型的构象不同。

三、免疫球蛋白超家族

免疫球蛋白超家族是同源分子的大家族,介导细胞识别。这一家族的突出特点是结构域中有1个被二硫键包绕的多肽链的压缩区域。其家族成员包括:细胞间粘附分子－1(ICAM－1),ICAM－2,ICAM－3,淋巴细胞功能相关抗原－3(LFA－3)和血管细胞粘附分子－1(VCAM－1)。

(一)ICAM－1

ICAM－1(又名CD54)最初被描述为淋巴细胞活化的标志,外周血白细胞表达较弱,但T细胞和B细胞在受到丝裂原刺激后,其表达显著上调。

ICAM－1呈弯曲杆状,长约18.7 nm,含有1个55 kDa的跨膜核心蛋白和5个可变的高度糖基化的免疫球蛋白样结构域。

在人的正常组织中,表达ICAM－1的细胞有:血管内皮细胞、牙龈结合上皮、胸腺上皮细胞、成纤维细胞、淋巴样组织中的巨噬细胞和其生发中心的树突状细胞、扁桃体粘膜上皮细胞和朗格汉斯细胞。

ICAM－1可以结合许多配体,包括$\alpha_1\beta_2$、$\alpha_2\beta_2$整合素和鼻病毒。这3个配体在ICAM－1上的结合部位是不同的:$\alpha_1\beta_2$整合素结合ICAM－1氨基末端免疫球蛋白样结构域,鼻病毒结合相

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

同的结构域，$\alpha_2\beta_2$ 整合素结合 ICAM－1 第三个免疫球蛋白样结构域。实验证明，RR1/1 抗体和 CL203.4 抗体以相似的亲和力结合 ICAM－1 的 2 个分散的抗原决定簇，其抑制多种 ICAM－1 介导的细胞功能的能力不同，说明结合 ICAM－1 的不同部位将导致不同的功能。β_1 整合素和 ICAM－1 的胞浆结构域都结合 α－辅肌动蛋白，故 α－辅肌动蛋白为白细胞在上皮细胞之间游走提供了一个稳定的立足点。

ICAM－1 的循环形式(cICAM－1)仍有结合 $\alpha_1\beta_2$ 整合素的能力。在人类 T 细胞白血病病毒 1 型相关的骨髓病、成人 T 细胞白血病、恶性黑色素瘤和银屑病患者血清中，观察到 cICAM－1的水平升高。

（二）ICAM－2

实验中发现，有时 ICAM－1 的抗体不能抑制 ICAM－1 与 $\alpha_1\beta_2$ 整合素结合，这就导致了第二个 $\alpha_1\beta_2$ 整合素配体的发现。第二个 $\alpha_1\beta_2$ 整合素配体与 ICAM－1 同源，被命名为 ICAM－2。

ICAM－2 有 1 个 33 kDa 的核心蛋白和 2 个免疫球蛋白样结构域，能与 $\alpha_1\beta_2$ 整合素结合，但不能与 $\alpha_2\beta_2$ 整合素结合。内皮细胞可表达 ICAM－2，而多形核白细胞不表达 ICAM－2。ICAM－2是静止内皮细胞上 $\alpha_1\beta_2$ 整合素的主要配体，在淋巴细胞的生理性再循环中起重要作用。

（三）ICAM－3

ICAM－3 是 $\alpha_1\beta_2$ 整合素的第三个配体。ICAM－3 的核心蛋白的分子量为 87 kDa，同 ICAM－1和 ICAM－2 一样，ICAM－3 是一个高度糖基化的蛋白。ICAM－3 与ICAM－1同源，也含 5 个免疫球蛋白样结构域。ICAM－3 在未受刺激的外周血淋巴细胞、单核细胞和多形核白细胞上表达，但在静止的或细胞因子刺激的内皮细胞上不表达。ICAM－3 可表达于肺上皮细胞，但不表达于肠上皮细胞。

（四）VCAM－1

VCAM－1 最初被认为是黑色素瘤—内皮细胞粘附的介质，VCAM－1 的主要形式有7 个免疫球蛋白样结构域，第一和第四结构域形成二价结合以便独立结合 $\alpha_4\beta_1$ 整合素。

在体内的正常皮肤微血管中未检测到或偶尔检测到 VCAM－1，而在体外人脐静脉内皮细胞或人皮肤微血管内皮细胞上也未检测到 VCAM－1，然而体内正常冠状动脉可表达 VCAM－1。在各种炎症病损中，VCAM－1 表达于毛细血管后小静脉内皮细胞和巨噬细胞样细胞上。VCAM－1 还可以和 E－选择素在一些毛细血管后小静脉上联合表达。在外周血淋巴细胞上不能检测到 VCAM－1，但外周淋巴结和扁桃体滤泡区的树突状细胞及胎儿胸腺的巨噬细胞亚群却表达 VCAM－1。

单核细胞和淋巴细胞通过白细胞受体 CD49d/CD29(VLA－4)与内皮细胞的 VCAM－1 结合，白细胞受体表达于淋巴细胞、单核细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞上，而不表达于多形核白细胞。重组型 VCAM－1 与记忆 T 细胞的 CD8 亚群优先结合。白细胞和内皮细胞上细胞粘附分子的表达总结于表 8－3。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

表 8-3 白细胞和内皮细胞上表达的细胞粘附分子

	中性粒细胞	单核细胞	淋巴细胞	内皮细胞	可溶形式
$\alpha_1\beta_2$	+	+	+	-	-
$\alpha_2\beta_2$	+	+	+	-	-
$\alpha_3\beta_2$	+	+	-	-	-
L-选择素	+	+	+	-	有
P-选择素	-	-	-	+	有
E-选择素	-	-	-	+	有
ICAM-1	-	+[a]	+	+	有
ICAM-2	-	-	+(?)	+	-
ICAM-3	+	+	+	-	-
VCAM-1	-	+[b]	-	+	有

a:淋巴样组织中的单核细胞;b:炎症病损中的巨噬细胞样细胞

四、钙粘附素家族

钙粘附素家族为钙离子依赖型粘附分子,广泛存在于细胞表面,均为单链跨膜糖蛋白,主要参与特定组织或器官同型细胞间粘附。该家族既可作为受体,也可作为配体,在钙离子存在时,钙粘附素主要是通过同型分子相互作用介导细胞与细胞粘附,在邻近细胞间建立分子连接,在粘着连接部位形成拉链样结构。基于结构和功能的相似性,钙粘附素被认为是一个超家族,包括一系列成员。

(一)分类

1. *根据其组织分布特性分类* 根据其组织分布特性,钙粘附素家族分为4类:①E-钙粘附素:主要分布于内皮细胞的胞膜上;②P-钙粘附素:主要分布于胎盘组织;③L-钙粘附素:主要分布于肝脏;④N-钙粘附素:主要分布于神经组织。

2. *根据其序列特征分类* 根据其序列特征,钙粘附素家族亦分为4类:①经典钙粘附素;②桥粒钙粘附素;③原钙粘附素;④钙粘附素相关蛋白。

(二)结构

钙粘附素的典型结构包括5个胞外重复结构域、1个跨膜区和1个胞浆结构域。胞外重复结构域包含许多钙粘附素特异性重复序列,后者通常由大约110个氨基酸残基组成,包含多个高度保守的氨基酸序列。其粘附功能位于第一结构域的氨基末端,粘附界面在该分子的同一侧,约位于β折叠的F链中央,此处含1个保守的组氨酸—丙氨酸—缬氨酸(HAV)序列,HAV决定其粘附特性。钙粘附素的结构和功能的多样性主要表现在胞外结构域。与胞外结构域相比,钙粘附素的胞内区结构多变。钙粘附蛋白通过与胞内连环蛋白(catenin)作用,调节和控制细胞的活动。此外,钙粘附素可能参与了胚胎发育和疾病过程中的细胞信号传导。

(三)各种钙粘附素亚家族的结构和功能特征

1. *经典的钙粘附素亚家族* 其N端的信号序列连接1个含有蛋白酶的前序列K/RRXKR,前序列的N端是细胞外结构域,前序列的C端为胞内结构域,二者由1跨膜片段连接。成熟经典钙粘附素的细胞外结构域具有5个重复序列,每一重复序列除具有共同特性外,还各有其特性。N端第一个重复序列(EC1)含有介导钙粘附素特异性粘附的结构域。5个重复序列形

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

成4个钙粘附素结合“袋”。钙粘附素必须与钙离子结合形成复合体才具有粘附功能，且可防止细胞外蛋白酶的作用。所有的经典钙粘附素均具有高度保守的胞内结构域，约含150个氨基酸，是连环蛋白的结合部位，连环蛋白连接钙粘附素与细胞结构蛋白。

E－钙粘附素是经典钙粘附素的1种，它是120 kDa的细胞表面跨膜糖蛋白，主要由内皮细胞表达。人类的E－钙粘附素基因位于染色体16q22.1上。E－钙粘附素与连环蛋白结合成复合体而行使功能，该复合体主要位于同种上皮细胞侧面细胞连接处。连环蛋白主要分为α－连环蛋白(102 kDa)，β－连环蛋白(88 kDa)，γ－连环蛋白(82 kDa) 3种类型。α－连环蛋白的正常表达是E－钙粘附素行使正常功能的重要条件，具有正常E－钙粘附素表达而缺乏α－连环蛋白的细胞，不能够相互粘附聚集，α－连环蛋白基因缺失和蛋白质突变均可导致细胞解聚而失去粘附。

E－钙粘附素在正常细胞中的表达是稳定的，但在癌细胞中的表达则常不稳定。E－钙粘附素的功能调节障碍与肿瘤的浸润和转移有关。E－钙粘附素或连环蛋白的异常致肿瘤细胞容易解离，增强了肿瘤细胞的侵袭性。E－钙粘附素被认为是甲状腺癌、鳞癌、子宫内膜癌和胃癌的一种分化标志，E－钙粘附素的表达随肿瘤的不同等级和病理类型而不同。

2. *桥粒钙粘附素亚家族* 其结构与经典钙粘附素非常相似，但桥粒钙粘附素的胞内结构域较长，与经典钙粘附素同源性差。这种独特的胞内序列可能有利于桥粒直接或间接地与细胞中间丝蛋白相互作用。它是角质细胞的主要细胞粘附分子。

3. *原钙粘附素和原钙粘附素相关蛋白亚家族* 该亚家族存在于许多非脊椎动物，如果蝇、线虫、海胆、水螅和涡虫，推测每一种多功能性的细胞生物均表达原钙粘附素或原钙粘附素相关蛋白。其结构与经典钙粘附素的结构相似，但没有前序列。其胞外结构域含有5个以上的，在长度和序列特性方面非常相似的重复序列，这些重复序列与经典钙粘附素的EC2s或EC4s相似，但不具有经典钙粘附素EC3s和EC5s的特性；其胞内结构域序列差异较大，表明家族成员具有明显的异质性。

五、CD44

CD44是近年来研究较多的粘附分子家族，是一种几乎普遍表达的跨膜糖蛋白，由单一基因编码。CD44介导淋巴细胞归巢、活化、细胞迁移、炎症以及肿瘤转移等。CD44至少包括2种CD44s分子和14种分子量不同的CD44v分子，执行不同的生物学功能。CD44的生物学功能多样性可能由CD44蛋白的异源性所决定。

(一)CD44的基因结构

CD44基因定位于人第11号染色体短臂p14～13上，定位于小鼠第2号染色体短臂上。人CD44基因组cDNA长度超过50 kb，至少包括20个外显子和其间的内含子。每个外显子的长度为70～210 bp，内含子长度为300～420 bp。CD44外显子按其转录片段是否参与选择性剪接分为2种类型，一种是组成型外显子(constitution exon，C－exon)，另一种是选择性剪接外显子，又称变异体外显子(variant exon，V－exon)。仅含组成型外显子的CD44称为标准型CD44(standard CD44，CD44s)，它所编码的CD44蛋白有4个功能区，即信号肽、N末端细胞外结构域、跨膜区、C末端胞浆内结构域。含变异体外显子的CD44统称为CD44v。各种外显子的编码区域和参与组成CD44分子的情况见表8－4。

有10个选择性拼接外显子，总长仅1 245 bp，而其内含子却长达23.6 kb，在染色体DNA

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

上跨越 25 kb 左右。CD44v 转录片段插入 CD44s 第 222 个密码子的第 1 和第 2 个核苷酸之间，最长可达 1 245 bp，所编码的氨基酸序列正好位于靠近胞膜的胞外区。变异体外显子之间既可跳跃式拼接，也可连续拼接。目前已得到证实的 CD44v 分子有 10 余种。

表 8-4 CD44 分子的基因结构

外显子序列	名称	编码区域	组成的 CD44 分子
1～5	C-exon	5′端 200 bp 非翻译区，信号肽，N 末端胞外区的 664 bp 核苷酸序列	各种 CD44
6～15	V-exon	胞外区	不同的 CD44 v
16～17	C-exon	胞外区近胞膜的 80 bp 核苷酸序列	各种 CD44
18	C-exon	跨膜区和胞内近胞膜的 9 bp 核苷酸序列	各种 CD44
19	C-exon	胞浆内区前 9 bp 核苷酸相关的 3′-非翻译区(943 bp)	CD44 的短尾形式
20	C-exon	胞浆内区 201 bp 核苷酸序列和 3′-非翻译区(154 bp)	CD44 的长尾形式

(二)CD44 的配体

CD44s 的配体主要为透明质酸，而 CD44v 能否结合透明质酸目前仍有争论。此外，层粘连蛋白、纤连蛋白以及Ⅰ型和Ⅳ型胶原等也可作为 CD44 配体。透明质酸与 CD44 结合，在 CD44 介导的细胞—细胞和细胞—基质粘附以及信号传导中起关键作用，透明质酸介导的 CD44 信号传导途径影响细胞骨架的完整性，并且能够刺激细胞因子的释放。

(三)CD44 的生物学功能

1.*作为透明质酸受体* 对克隆的人和小鼠 CD44 cDNA 序列进行分析，发现在 CD44 结构中存在一个高度保守的氨基末端结构域，与软骨连接蛋白和蛋白多糖核心蛋白的透明质酸结合结构域之间具有高度同源性，因而提出 CD44 可能是一种透明质酸受体。随后又检测了 CD44s 结合透明质酸的活性及其特异性，结果表明透明质酸受体就是 CD44，是一种特殊的细胞粘附分子，但需要激活后才能有效地与透明质酸结合。CD44 的胞浆结构域，特别是第 305～320位氨基酸序列，是其行使粘附功能必需的。

2.*参与淋巴细胞再循环和介导多种细胞粘附* 抗 CD44 抗体在与毛细血管后小静脉高内皮细胞结合的淋巴细胞上呈阳性表达，并且 CD44 抗血清可有效阻断淋巴细胞结合毛细血管后小静脉高内皮细胞，说明 CD44 参与循环淋巴细胞与毛细血管后小静脉高内皮细胞之间的相互作用。多克隆抗血清可以广泛抑制淋巴细胞和各种高内皮细胞相互作用，因而认为 CD44 可能参与了淋巴细胞再循环中的多个环节。

抗 CD44 抗体通过与红细胞上的 CD44 作用而抑制人红细胞与 T 细胞粘附，证明 CD44 参与了人红细胞与 T 细胞粘附。此外，CD44 还介导同型细胞之间的粘附作用，T 细胞、B 细胞或单核细胞可由 CD44 介导而发生同型粘附作用，CD44 活化后的转化细胞亦可发生自身凝集现象。

3.*影响 T 细胞激活和增强 NK 细胞活性* CD44 分子对 T 细胞激活过程有增强作用，抗原刺激后 CD44 分子表达暂时性升高。CD44 可诱导 NK 细胞和加入 IL-1 或 IL-12 培养 24～48 小时的 T 细胞发生细胞毒作用，表明它是一种触发分子，直接传导激活 NK 细胞的跨膜

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

信号。

4. *CD44变异体与肿瘤的转移有关* CD44变异体在鳞状上皮中有丰富的表达，而在头颈部鳞癌和大多数转移性肿瘤标本上，上皮型的变异体表达显著减少。

六、细胞外基质分子

（一）纤连蛋白

1. *纤连蛋白的基因结构* 纤连蛋白的结构基因位于人2号染色体上，为单基因编码，但其初始转录产物的选择性剪接可产生至少200种具不同生物活性的蛋白，因而又可称为"纤连蛋白家族"。编码纤连蛋白的基因具有48个外显子，其中3个有选择性剪接，即ED-A、ED-B和ⅢCS外显子。ⅢCS外显子的选择性剪接，决定α_4整合素亚单位识别的受体位点的存在与否。纤连蛋白的选择性剪接有组织特异性。

2. *纤连蛋白的结构特征* 正如其他许多细胞粘附分子一样，纤连蛋白的分子量很大，为440 kDa。纤连蛋白包含许多结构域，这些结构域含有大量主要细胞表面成分的结合位点。这些细胞表面成分即胶原蛋白、硫酸软骨素蛋白聚糖、神经节苷脂、纤维蛋白原、DNA和其他几种整合素。

3. *纤连蛋白的分布* 纤连蛋白是一组独特的细胞粘附分子，广泛分布于口腔和许多其他组织中，在血清中和许多类型细胞表面均发现了纤连蛋白。

4. *纤连蛋白的功能和应用* 纤连蛋白具有组织细胞外基质的能力，尤其是参与细胞粘附作用。纤连蛋白具有纤维蛋白原和DNA结合位点，这两个位点涉及纤连蛋白参与清除损伤组织片段的调理活性。纤连蛋白还可粘附多种细菌、真菌和病毒。

由于纤连蛋白具有细胞粘附活性和粘附硬组织（包括牙本质）的能力，有人尝试使用纤连蛋白作为"胶水"重建牙龈对牙面的附着，但这种尝试在牙周膜缺失的再生中未获得明显成功。可能是由于在应用外源性纤连蛋白之前，组织已被天然纤连蛋白饱和。

微生物粘附纤连蛋白对微生物和宿主来说都是有利的。纤连蛋白粘附代表微生物的定植机制，宿主可将其用来作为吞噬细胞吞噬微生物的一种方式。已发现口腔中变形链球菌和其他口腔细菌粘附于纤连蛋白，而拟杆菌和其他细菌却包含有特异性消化纤连蛋白的蛋白酶。

（二）层粘连蛋白

1. *层粘连蛋白的结构* 层粘连蛋白是高分子量且重度糖基化的蛋白，糖基化约25%～27%（w/w），分子量约890 kDa。层粘连蛋白包含3个亚单位：A链（440 kDa），B1链（220 kDa），B2链（230 kDa）。A链含RGD序列，B1链含有可结合细胞层粘连蛋白受体的YIGSR序列。电镜观察发现层粘连蛋白有十字样结构。层粘连蛋白上有Ⅳ型胶原、硫酸肝素蛋白聚糖、肝素、触觉蛋白和层粘连蛋白受体结构域，以及负责细胞粘附、有丝分裂效应、细胞移动、神经生长和骨分化的结构域。

2. *层粘连蛋白的分布和功能* 层粘连蛋白存在于所有的基底膜，介导上皮细胞对Ⅳ型胶原的粘附。层粘连蛋白是一种多功能蛋白，参与基底膜结构、细胞粘附、伤口愈合、转移、细菌粘附、神经生长和其他生物学功能。目前，仅知道糖基化有促进肿瘤细胞粘附的作用。

体内研究证实，层粘连蛋白具有多种功能。神经损伤致层粘连蛋白的产生增加，并伴随神经元再生增加；外源性层粘连蛋白可促进人牙龈上皮细胞的移动，因而可能在伤口愈合中有作用，而层粘连蛋白抗体可抑制上皮细胞的移动，故层粘连蛋白具有趋化能力；层粘连蛋白具有

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

与牙本质表面结合的能力,体外实验发现层粘连蛋白促进上皮细胞在牙本质表面附着,因而研究者提出了这样的假设:层粘连蛋白在上皮细胞根向移动形成牙周疾病深袋过程中起作用,层粘连蛋白抗体用于终止牙周疾病的进展具有潜在的应用价值。

在临床研究中,层粘连蛋白在肿瘤相关的基底膜中量增加,在肿瘤转移时层粘连蛋白的血清水平增加,因而层粘连蛋白可以作为肿瘤发生和转移的可能标志。再者,重组基底膜检测已用于诊断肿瘤细胞的浸润性。

层粘连蛋白可结合几种革兰阳性细菌,在金黄色葡萄球菌中也证实有层粘连蛋白受体。这些研究表明层粘连蛋白可能在牙周疾病、龋病和多种其他需要细菌粘附的感染过程中有重要作用。

(三)玻连蛋白

玻连蛋白也属于细胞粘附蛋白家族,结构上含有特征性的 RGD 序列。1967 年,从人血清中首次分离出玻连蛋白,发现它具有促进玻璃珠上的细胞粘附和扩散的功能。根据其生物学活性,称之为"血清扩散因子"。生化和免疫分析发现它与具有相似活性的纤连蛋白不同。已发现 2 种不同分子量的玻连蛋白(75~78 000 kDa 和 65~70 000 kDa)。

70 年代从人血浆中分离出"S-蛋白",是主要的肝素结合糖蛋白。但 cDNA 序列显示 S-蛋白和玻连蛋白是相同的蛋白。

1.玻连蛋白的分布 玻连蛋白主要在肝脏合成,健康个体的平均血浆浓度为 0.35 g/L,在失代偿的肝硬化疾病时其水平可变化。

与纤连蛋白一样,玻连蛋白与疏松结缔组织的弹性纤维有关。但是,与纤连蛋白不同,在基底膜、正常的肾小球或胃肠道平滑肌细胞周围检测到玻连蛋白。玻连蛋白在皮肤中的定位随年龄的改变而有明显的变化。玻连蛋白在 6 岁以下的人皮肤弹性纤维中未检测到,而在 13 岁后的皮肤弹性纤维可检测到。暴露于日光的表皮区域,其玻连蛋白的染色强度较其他区域强。根据玻连蛋白的特殊分布部位和与年龄相关分布的特点,可推测玻连蛋白有防止补体激活部位附近组织损伤的作用。

在纤连蛋白存在的纤维化区域,玻连蛋白增加。玻连蛋白尤其见于结节性硬化性 Hodgkin 病的淋巴结、转移癌累及的淋巴结、髓纤维化骨髓,以及硬化的肾小球中。表明玻连蛋白可能参与炎症和修复过程。

近来研究发现玻连蛋白在牙周韧带中浓度高,在其他的牙周组织中的染色较弱,其意义尚不清楚。

2.玻连蛋白在细胞粘附、免疫防御、血液凝固和纤维降解中的作用 细菌粘附是细菌定植和激活宿主免疫反应的重要起始步骤。玻连蛋白有链球菌的特殊结合部位,且与同纤连蛋白结合的部位不同。此外,玻连蛋白还介导链球菌对人上皮细胞的粘附。

在补体激活过程中,玻连蛋白对保护宿主器官免受细胞裂解起特殊作用。在通常的补体激活过程中,在 C_5~C_8 装配后 C_9 聚合,补体复合体嵌入细胞膜形成膜穿孔,导致细胞裂解。玻连蛋白与 C_5b-7 前体复合体紧密结合,阻止水溶性的 SC_5b-7 插入细胞膜,因此玻连蛋白可对抗膜攻击复合体(MAC)。而且,玻连蛋白以浓度依赖方式抑制 C_9 本身的聚合。玻连蛋白的保护作用在富含玻连蛋白的部位特别重要,如血管壁,使这些部位可能更好地免受自体补体的攻击。

在血液凝固过程中,通过抗凝血酶Ⅲ或肝素辅助因子的作用,肝素和其他葡糖胺聚糖(gly-

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

cosaminoglycans)能抑制凝血酶活性。玻连蛋白用其肝素结合位点结合肝素上的抗凝血酶Ⅲ的结合位点而干扰这种抑制机制。这种干扰作用发生在血管壁的管腔面，因而对凝固过程有重要意义。

玻连蛋白也参与血管壁损伤后的纤维蛋白溶解的调节。在损伤后的早期阶段，玻连蛋白通过抑制纤溶系统的活化而提供血栓形成前效应。玻连蛋白可结合 PAI－1 蛋白，而 PAI－1 在纤维蛋白溶酶原转化为纤维蛋白溶酶过程中有重要的调节作用。已从牛主动脉内皮细胞中分离出 PAI－1－玻连蛋白复合体，此复合体的存在可能为这些血管区域提供抗纤溶的能力。

(四)肌腱蛋白

肌腱蛋白由几个研究小组独立发现，因而名称多样，如神经胶质瘤间充质基质蛋白、肌腱抗原、六臂蛋白、细胞趋化素和 J－1。现在，肌腱蛋白是最常用的术语。

1.*肌腱蛋白的结构*　肌腱蛋白是细胞外基质中巨大的寡聚糖蛋白，包含二硫键连接的 3 个亚单位，分子量分别为 220 kDa、200 kDa 和 190 kDa。电镜下观察，肌腱蛋白的主要形式是特征性的六臂寡聚体。肌腱蛋白含有 RGD 氨基酸序列，位于细胞结合位点内。

2.*肌腱蛋白的来源和分布*

(1)肌腱蛋白的来源：肌腱蛋白主要由纤维母细胞和神经胶质细胞分泌，最好的来源为胶质瘤细胞系 U－251MG 和鸡胚胎成纤维细胞，培养的人成纤维细胞产生很少的肌腱蛋白。在不同类型的增殖上皮细胞附近肌腱蛋白的积聚，提示上皮细胞产生刺激因子，刺激邻近组织的成纤维细胞产生肌腱蛋白。此外，在胶质瘤、纤维肉瘤、骨肉瘤、鳞状细胞癌和其他肿瘤中，肌腱蛋白也很丰富。

(2)肌腱蛋白的分布

①肌腱蛋白在牙齿、软骨和骨中的分布：对牙齿发育期肌腱蛋白的分布研究发现，肌腱蛋白存在于牙间质细胞中，贯穿于牙齿形成过程。牙乳头间质染色强，即使在牙冠发育完成和牙萌出后，肌腱蛋白也表达于牙髓组织。当牙乳头细胞分化为造牙本质细胞后即停止表达肌腱蛋白，牙本质缺乏肌腱蛋白。提示肌腱蛋白在硬组织形成细胞的生长和分化中起作用。

在颞下颌关节内，肌腱蛋白存在于半月板、关节面、骨、关节囊和滑膜上。肌腱蛋白在髁突和颞骨的成软骨细胞层，以及这些结构的软骨层呈强表达。肌腱蛋白在颞下颌关节的分布再一次支持肌腱蛋白是软骨发生的促进因子的这一认识。

肌腱蛋白在新生大鼠的颅骨中的表达提供了其在硬组织发育中的作用的又一证据。肌腱蛋白主要局限于骨、软骨和牙齿，存在于膜骨的骨外膜面和骨内膜面、软骨周围和牙髓中，而成熟骨、软骨和牙本质却缺乏肌腱蛋白。肌腱蛋白仅存在于增殖的髁突软骨和趋向成熟的细胞层。肥大的软骨缺乏肌腱蛋白。因为在骨外膜和肌肉附着区域检测到肌腱蛋白，所以认为肌腱蛋白在骨的重塑中起作用。

②伤口愈合中的肌腱蛋白：肌腱蛋白在伤口愈合和修复中起重要作用。成人的肌肉缺乏肌腱蛋白，如果支配肌肉的神经被切断或受损伤，肌腱蛋白主要聚集在运动原终末板附近的细胞外基质中。随着神经再支配的形成，肌腱蛋白又消失。在皮肤伤口愈合过程中，肌腱蛋白聚集于肉芽组织和伤口的深层组织，在生长的表皮下也存在肌腱蛋白。当伤口完全再上皮化和伤口收缩后，肌腱蛋白又再次消失。肌腱蛋白出现于伤口再上皮化之前，可能是由巨噬细胞和白细胞等刺激所致。炎症介质 TGF－β 诱导培养的鸡胚胎成纤维细胞的肌腱蛋白分泌增加 4 倍。体外观察也发现，肌腱蛋白能改变人单核细胞、B 细胞和 T 细胞的粘附性，因而产生免

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

疫调节效应。

(五)骨桥蛋白

骨桥蛋白以前称为骨唾液蛋白Ⅰ(BSPⅠ)、2ar、分泌性磷酸蛋白Ⅰ等。首先发现于骨基质中,是骨基质中含量丰富且具有细胞粘附活性的唾液蛋白。

1.*骨桥蛋白的结构* 用平衡沉降法测得大鼠骨桥蛋白的分子量为44 kDa,而从克隆蛋白序列推算其分子量为33 kDa。人类骨桥蛋白含314个氨基酸,其cDNA已被克隆,由cDNA推算的多肽序列与大鼠的骨桥蛋白具有65%的同源性。由于其有许多酸性氨基酸,包括9个天冬氨酸残基,因而骨桥蛋白带很多负电荷,故骨桥蛋白可以和羟磷灰石紧密结合。骨桥蛋白的RGD序列具有保守性。玻连蛋白的整合素受体可能是骨桥蛋白的受体。骨桥蛋白的氨基酸序列分析显示,在其二级结构中存在1个钙结合环和2个肝素结合部位。

骨桥蛋白代表一多基因家族,已发现了骨桥蛋白的第二个基因和其编码的蛋白——骨桥蛋白2。此外,还报道了多种具有不同性质和对生长因子表现不同合成反应的骨桥蛋白形式,表明骨桥蛋白经历了不同程度的转录后修饰,包括磷酸化、硫酸化和糖基化,转录后修饰在调节骨桥蛋白的功能中起重要作用。

2.*骨桥蛋白的分布* 用免疫组织化学和原位杂交方法检测,发现骨桥蛋白表达于成骨细胞、骨细胞、骨原细胞和几种组织,包括前牙本质、类骨质、肾和胎盘。骨桥蛋白的mRNA水平在成骨样肉瘤细胞、颅盖和肾中最高,在蜕膜的肉芽性产后子宫炎的腺体、尿道上皮和内耳的神经上皮细胞中较低,在脑和肺中最低。在骨形成过程中,在各种胎儿膜骨或软骨内生骨矿化开始前均可检测到骨桥蛋白。

3.*骨桥蛋白的功能* 骨桥蛋白的生理意义迄今未研究清楚,但认为该蛋白有几种有效的作用。骨桥蛋白可能参与锚着成骨细胞在其底物上,参与骨和矿物质的代谢;骨桥蛋白结合钙的能力可能有利于钙调节;可能参与骨的吸收过程;可能参与癌发生和转移。此外,在牙周组织中,骨桥蛋白首先增强牙龈成纤维细胞附着,此结果在发展和评价针对促进结缔组织对根面附着的新方法中有重要意义。

(六)骨连接蛋白

骨连接蛋白是磷酸化糖蛋白,与Ca^{2+}、羟磷灰石和Ⅰ型胶原有高亲和力。尽管该分子名字意指细胞粘附活性,但这种活性还未被证实。

1.*骨连接蛋白的结构* 骨连接蛋白为单肽链,SDS—PAGE测得其分子量为43 kDa,而根据其cDNA序列推算的分子量为33 kDa。在人、牛和鼠细胞中,骨连接蛋白由单拷贝基因编码,在这些种属中骨连接蛋白有90%以上的同源性。人骨连接蛋白的cDNA编码286个氨基酸,在N末端谷氨酸残基丰富的区域有一个Ca^{2+}结合结构域,在C末端侧面有两个"EF手"区域。该蛋白也富含有种间保守的半胱氨酸残基。骨连接蛋白结构上的高度保守性决定了其在进化中的保守性。

2.*骨连接蛋白的分布* 骨连接蛋白是骨中最丰富的非胶原蛋白,约占总蛋白的15%。牙本质中有少量的骨连接蛋白。与人相比,猪、鸡和鼠骨和牙本质含骨连接蛋白较少。骨连接蛋白表达于成骨细胞、软骨细胞、成纤维细胞、血小板、基底膜、内皮细胞、上皮细胞和各种肿瘤细胞中。在鸡的胫生长软骨中,在前矿化和矿化区的软骨细胞产生骨连接蛋白,但只在矿化区域堆积。推测由于骨连接蛋白对钙的高亲和力,故骨连接蛋白滞留于正钙化的骨基质中,骨连接蛋白和钙的堆积可加速钙化过程。在软的结缔组织包括牙周膜、骨内膜、牙髓和牙龈中也检测

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

到骨连接蛋白。骨连接蛋白亦表达于产生激素的细胞，包括 Leydig 细胞、Sertoli 细胞、黄体细胞和肾上腺皮质细胞。血小板可能是循环骨连接蛋白的主要来源。

在鼠胚胎发育中，骨连接蛋白的 mRNA 首先见于种植的胚泡细胞，稍后见于壁内胚层、肠粘膜下组织、表皮、Schann 细胞、造牙本质细胞和蜕膜细胞。在鼠胚胎骨形成时，骨连接蛋白 RNA 首先在骨化区和肥大的软骨细胞中检测到，稍后发现于骨髓中邻近骨基质的细胞。体外新生鼠下颌髁突的骨分化细胞中，依次表达 I 型胶原、骨连接蛋白、碱性磷酸酶和骨 GLA 蛋白的 RNA。

体外胰岛素样生长因子－1（IGF－1）、TGF－β 和地塞米松，可刺激大鼠成骨前体细胞中骨连接蛋白的转录，这种效应可被维 A 酸抑制。体内雌激素抑制大鼠骨连接蛋白和其他几种骨基质蛋白的表达。胶原蛋白和凝血酶能以剂量依赖方式刺激骨连接蛋白从人血小板中释放。因此，骨连接蛋白的表达和分泌受多种激素、生长因子和基质蛋白的调节。

3.骨连接蛋白的作用　骨连接蛋白的真正作用尚不清楚。基于其高度结合 Ca^{2+} 和 I 型胶原的活性，以及在正矿化和矿化了的基质中堆积特点，认为其可能参与矿化过程。然而，骨连接蛋白也大量存在于不矿化的细胞和组织中，而且，骨连接蛋白在胚胎组织、胎儿组织、肿瘤和其他更新率高的组织中呈高水平表达，因此认为，骨连接蛋白在许多生物学过程，如发育、分化和组织重塑过程中具有不同的作用。实际上，与其他的基质蛋白一起，骨连接蛋白常被作为骨性分化的标志。既然在牙周疾病患者的龈沟液中检测到骨连接蛋白，故其可能作为牙周疾病诊断的有用标志。

（七）软骨连接蛋白

1.软骨连接蛋白的结构　软骨连接蛋白是一种粘附糖蛋白，介导软骨细胞对软骨中 II 型胶原的附着，是二硫键连接的三聚体结构，分子量为 175.8 kDa，二硫键还原后还有 1 个 55.5 kDa的亚单位。基于电子显微镜下呈旋转阴影，认为软骨连接蛋白为致密的球形结构。尽管软骨连接蛋白的作用与纤连蛋白和层粘连蛋白相似，即促进成纤维细胞和上皮细胞的附着，但其大小、氨基酸成分、碳水化合物部分和组织定位不同。软骨连接蛋白较纤连蛋白和层粘连蛋白小，较纤连蛋白更不耐热，每三聚体中有 7 个碳水化合物部分，而纤连蛋白只有 6 个，层粘连蛋白有 14 个。虽然软骨连接蛋白用胶原酶、弹性蛋白酶和神经氨酸酶处理后的细胞结合活性仍稳定，用胰蛋白酶消化也需延长时间，但附着仍需完整的结构。纯化软骨连接蛋白较困难，因此该蛋白还未测序，其基因也未克隆出来。

2.软骨连接蛋白的分布　软骨连接蛋白存在于软骨、玻璃体、人滑液和血清中，血清水平为 10 mg/L，比纤连蛋白约低 10 倍。软骨中软骨连接蛋白与 V 型胶原分布相似，集中于细胞和基质交界处的软骨细胞周围的基质中，不像是主要的基质成分，而是细胞相关蛋白。尽管层粘连蛋白和纤连蛋白与其胶原底物直接作用，不需要蛋白聚糖来维持基质—粘附蛋白—细胞复合体的稳定性，但是软骨连接蛋白对胶原的亲和力低得多，其稳定附着依赖于完整的蛋白聚糖，它直接结合软骨蛋白聚糖的脂多糖部分。加入硫酸软骨素葡糖胺聚糖会阻止软骨连接蛋白介导的软骨细胞附着。血清软骨连接蛋白的抗体也可阻止软骨连接蛋白对 II 型胶原的附着。

滑液中的软骨连接蛋白水平，与白蛋白和纤维蛋白原的浓度高度相关，表明滑液中的软骨连接蛋白至少部分来自于血浆。滑液中的软骨连接蛋白可在滑液中聚集软骨细胞，可能是纤维血管翳形成的介质。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

尽管软骨连接蛋白—蛋白聚糖—胶原超分子(supramolecular)复合体增加软骨细胞附着于细胞外基质的稳定性,但软骨连接蛋白在疾病状态的作用仍不清楚。

(八)纤维蛋白原

1.*纤维蛋白原的结构* 纤维蛋白原是纤维素的糖蛋白前体,分子量为340kDa,为二聚体,含2对3条特殊的亚单位(Aα,Bβ和γ),由一系列的二硫键连接在一起。为简单起见,其结构可看作3部分——中心结构域或E结构域,分子两端的2个相同的D结构域。染色体联系和序列同源性研究表明,所有纤维蛋白原的3条链均从单一的祖先基因进化而来。Aα链上有2个RGD序列——RGDS和RGDF,故认为纤维蛋白原受体是整合素家族的成员之一。γ链和RGD序列在促进细胞的移动中共同起作用。

2.*纤维蛋白原的功能* ①纤维蛋白原是参与伤口愈合的血浆蛋白;②调节血小板的凝集,在血液凝固的链式反应的起始步中是凝血酶的底物;③参与炎症反应。

纤维蛋白原是伤口细胞外基质的主要组成成分,而且,先天性纤维蛋白原缺乏的患者伤口愈合障碍,这进一步支持纤维蛋白原是凝聚、粘附蛋白。包被有纤维蛋白原的底物可引起上皮细胞的移动,从而促进伤口愈合,因而可以考虑用纤维蛋白原作为伤口愈合的佐剂。

纤维蛋白原具有结合几种蛋白、细胞和细菌的能力。纤维素分子有负责自身装配的结合位点,而且,还有特殊位点以结合凝血酶、纤连蛋白的基质成分、透明质酸和整合素$\alpha_v\beta_3$。纤维蛋白原结合这些受体产生血小板—血小板粘附,并发生构象变化,致$\alpha_v\beta_3$受体能结合其他粘附蛋白。除血小板外,纤维蛋白原还可结合其他细胞如单核细胞、巨噬细胞、成纤维细胞、内皮细胞和几种细菌:金黄色葡萄球菌、链球菌、白色念珠菌、牙龈卟啉菌和中间普氏菌。

革兰阴性厌氧菌牙龈卟啉菌和中间普氏菌可能在牙周疾病中起作用。这些细菌有纤维蛋白原结合的特殊位点,而且,这些细菌含裂解纤维蛋白原的蛋白酶。这些细菌结合纤维蛋白原,随后消化纤维蛋白原,促进了这些细菌与牙周组织的结合。此外,当纤维蛋白原被细菌蛋白酶裂解后,血液凝固受损,因而产生组织破坏。

(九)胶原蛋白

1.*胶原蛋白结构* 胶原蛋白共同的基本结构为3条卷曲链形成3条螺旋,每一圈螺旋含3个氨基酸,甘氨酸位于每个第三位。分子末端的球形区在组织的处理和分子的稳定性中起重要作用。根据其亚分子结构,胶原蛋白分为纤丝形胶原蛋白(Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ和Ⅺ)和非纤丝形胶原蛋白(Ⅳ、Ⅵ、Ⅶ、Ⅷ、Ⅸ、Ⅹ、Ⅻ和XⅢ)。

胶原蛋白由散在于人基因组中的约20种不同的基因编码。纤丝形胶原蛋白基因较非纤丝形胶原蛋白的基因大5 kb,这些基因有显著同源性,含多个内含子和外显子,大多数外显子含1个编码碱性Gly-X-Y三联体的6倍重复序列。例如:编码α_1(Ⅰ)链的基因含41个外显子,其中大多数有1个编码Gly-X-Y三联体的6倍重复序列。在纤丝形胶原蛋白的三螺旋结构域中,有4个显性突变与骨发育不全、Ehlers Danlos综合征和软骨生成有关。总之,编码纤丝形胶原蛋白三螺旋结构域的外显子突变危害巨大,因为正常胶原蛋白纤丝的组装受到破坏会导致致死的结构缺陷。编码非纤丝形胶原蛋白的基因的外显子和内含子,较纤丝形的可变性大得多,其调节机制不同。

2.*胶原蛋白的功能* 胶原蛋白是纤维蛋白的一个家族,纤维蛋白提供结缔组织的结构框架。胶原蛋白除具有支持作用外,也提供基质特异性细胞附着位点,介导许多细胞的移动、分化和增殖。胶原蛋白直接与细胞作用的途径至少有3条:①通过识别Arg-Gly-Asp-Thr序

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

列的整合素受体；②通过纤连蛋白和层粘连蛋白等粘附蛋白；③通过蛋白聚糖。胶原蛋白对细胞分化的影响，根据胶原蛋白的表型和特殊的细胞类型而不同。

3.纤丝形胶原蛋白　纤丝形胶原蛋白包括Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ、Ⅴ和Ⅺ型胶原蛋白，最具胶原蛋白特征。纤丝形胶原蛋白与蛋白聚糖、糖胺多糖和纤连蛋白作用，形成复杂的细胞外基质，为组织提供特异的功能。所有的纤丝形胶原蛋白均有结合纤连蛋白的结构域，并通过纤连蛋白中的RGD序列与特异性高亲和力的细胞表面受体结合。

(1)Ⅰ型胶原蛋白：在皮肤、韧带、肌腱和骨中，Ⅰ型胶原蛋白是最丰富的胶原蛋白，是异三聚体，含2条α_1(Ⅰ)链和1条α_2(Ⅰ)链。除软骨细胞外，其产物主要在转录水平调节。它也有调节细胞粘附的作用。成纤维细胞通过$\alpha_2\beta_1$整合素直接结合裸露的Ⅰ型胶原蛋白。Ⅰ型胶原蛋白通过Arg-Gly-Asp-Thr序列结合骨肉瘤细胞，该序列与纤连蛋白的Arg-Gly-Asp-Ser细胞粘附序列相似。骨肉瘤细胞与Ⅰ型胶原蛋白结合，使其形态趋向正常，细胞骨架成分重排，说明结合胶原蛋白的细胞有连接细胞骨架成分和细胞外配体的受体。除细胞粘附序列外，Ⅰ型胶原蛋白有纤连蛋白和肌动蛋白的结合位点，还有小的蛋白聚糖硫酸软骨素和硫酸皮肤素的结合位点。这些小的蛋白聚糖调节神经嵴细胞的移动，神经嵴细胞是一群发育为许多面部结构，包括造牙本质细胞和臂弓的软骨细胞的细胞群。神经嵴细胞不恰当的移动将产生面部畸形如腭裂。

(2)Ⅱ型胶原蛋白：Ⅱ型胶原蛋白由增殖的软骨细胞产生，是同三聚体。在软骨中为细而无序的纤维，不仅提供张力，还为蛋白聚糖、透明质酸和连接蛋白的聚集提供支架。其调节与其他的胶原蛋白不同。当细胞分化为软骨细胞时，Ⅰ型胶原蛋白合成向Ⅱ型胶原蛋白合成的转变开始。在软骨分化过程中，软骨细胞用翻译控制来调节Ⅰ型胶原蛋白合成的中止。在Ⅰ型胶原蛋白合成向Ⅱ型胶原蛋白合成的转变过程中，Ⅰ型胶原蛋白的mRNA仍存在，但不翻译。Ⅱ型胶原蛋白有软骨连接蛋白和硫酸软骨素的结合位点。在缺乏蛋白聚糖时，Ⅱ型胶原蛋白对细胞或软骨连接蛋白只有低亲和力。

(3)Ⅲ型和Ⅴ型胶原蛋白：除骨缺乏Ⅴ型胶原蛋白外，通常Ⅲ型和Ⅴ型胶原蛋白伴随Ⅰ型胶原蛋白纤维存在。Ⅲ和Ⅴ型胶原蛋白在动脉粥样硬化形成中起重要作用，影响血管平滑肌细胞增殖和分化。在患脆骨综合征的婴儿骨内Ⅴ型胶原蛋白增加，提示Ⅴ型胶原蛋白干扰骨矿化。Ⅲ和Ⅴ型胶原蛋白与纤连蛋白和硫酸肝素蛋白聚糖相互作用。Ⅴ型胶原蛋白对肝素和硫酸肝素的亲和力，高于其他胶原蛋白、纤连蛋白或层粘连蛋白对肝素和硫酸肝素的亲和力。

(4)Ⅺ型胶原蛋白：Ⅺ型胶原蛋白较少，由3条不同的α链构成，发现于软骨和玻璃体肿瘤中。目前只知道其中1条链是α_1(Ⅱ)产物翻译后修饰产生，尚不知道Ⅺ型胶原蛋白的基因是如何被调节的。与其结合的特殊蛋白聚糖或粘附蛋白还未见报道。

4.非纤丝形胶原蛋白　在结构和功能上，非纤丝形胶原蛋白尽管具异质性，但其主要结构域仍然保留纤丝形胶原蛋白基本的Gly-X-Y重复序列。可分为软骨特异性胶原蛋白(Ⅸ、Ⅹ、Ⅺ、ⅩⅢ)和混杂胶原蛋白(Ⅳ、Ⅵ、Ⅶ、Ⅷ、Ⅻ)。

(1)软骨特异性胶原蛋白：Ⅸ型胶原蛋白由增殖的软骨细胞产生，由3条高度同源链构成，3条链除α_1(Ⅸ)链的氨基末端结构域不同外，其余部分均相同。α_1(Ⅸ)链的氨基末端结构域的功能是粘附软骨特异性蛋白聚糖到Ⅱ型胶原蛋白纤维。尽管相同的基因编码角膜特异性Ⅸ型胶原蛋白，但启动子的选择性使用和随后的选择性剪接产生角膜特异性胶原蛋白α_1(Ⅸ)链，

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

该链不含结合软骨特异性蛋白聚糖的结构域。因而，相同基因编码 2 种结构上不同的胶原蛋白，但形成特异性的细胞外基质凝聚物决定每种组织的功能。

Ⅹ型胶原蛋白仅由肥大的软骨细胞产生，表达调节发生于转录水平。尽管Ⅸ和Ⅹ型胶原蛋白表达的控制受细胞外基质包围的软骨细胞的影响，但其 mRNA 水平的变化受特殊基因的转录水平调节。

(2)混杂胶原蛋白

①Ⅳ型胶原蛋白：Ⅳ型胶原蛋白见于基底膜，在基底膜处构成巨大的三维弹性网，网上有上皮细胞的结合位点。Ⅳ型胶原蛋白分子在胚胎发生和血管发生过程中对细胞移动和分化起关键作用，它也有层粘连蛋白、硫酸肝素蛋白聚糖和纤连蛋白的特异结合位点。这些成分按一定程序相互作用，以至于在合适的条件下共同孵育，自我装配形成类似体内基底膜致密板的结构。编码Ⅳ型胶原蛋白两条链的基因位于 13 号染色体上，头对头排列，被 130 bp 的Ⅳ型胶原蛋白基因的启动子序列分隔开。正性和负性的 cis 成分和 trans 活化因子，联合调节Ⅳ型胶原蛋白基因的转录。

②Ⅵ型胶原蛋白：Ⅵ型胶原蛋白广泛分布于结缔组织，在其分泌以前组装成侧向四聚体，在其分泌后，在细胞外基质中组装成纵向聚合体。Ⅵ型胶原蛋白由短的 3 螺旋结构域和大的球性结构域构成，有广泛的二硫键交叉连接。Ⅵ型胶原蛋白微纤维促进细胞粘附和扩散。在其每一条链上均发现几个与细胞结合的 RGD 序列，RGD 肽不能抑制细胞粘附在Ⅵ型胶原蛋白上。Ⅵ型胶原蛋白的球形结构域与 von Willebrand 因子中的结构域相似，也与整合素受体和软骨基质蛋白的结构域相似。提示Ⅵ型胶原蛋白的球形末端可能以与 von Willebrand 因子、整合素受体和软骨基质蛋白相同的方式结合Ⅰ型胶原蛋白。因此，Ⅵ型胶原蛋白的功能可能是提供锚或桥的作用，锚着大的间质结构如神经、血管和胶原纤维进入周围的结缔组织。Ⅵ型胶原蛋白的表达与细胞形态和细胞增殖能力之间有一定相关性。

③Ⅶ型胶原蛋白：Ⅶ型胶原蛋白是上皮基底膜致密板中锚状纤维的主要成分，增强上皮基底膜对结缔组织基质的附着。在患退缩型营养不良性表皮松解性大疱病的婴儿中，唯一的异常特征是Ⅶ型胶原蛋白的异常或缺乏。

④Ⅷ型胶原蛋白：Ⅷ型胶原蛋白是特殊的胶原蛋白，局限于特殊的细胞外基质中，如眼巩膜、脊索、骨膜和软骨膜，这些结构大多数来自神经嵴。Ⅷ型胶原蛋白缺乏二硫键交叉连接，其功能和蛋白结合特征还不清楚。

⑤ⅩⅢ型胶原蛋白：ⅩⅢ型胶原蛋白见于表皮、毛囊、皮肤的甲根细胞、关节表面，以及骨骺边缘。因为在ⅩⅢ基因编码区内，前体 RNA 在 5 个不同位置的选择性剪接产生 4 种不同的 α1(ⅩⅢ)mRNA，所以ⅩⅢ型是一种独特的胶原蛋白。关于其细胞结合特性或与其他基质成分的联系一无所知。

第二节　炎症和免疫反应中的细胞粘附分子

炎症病损的静态图像，常常呈现炎性细胞在血管外组织紧密聚集；而动态图像显示，宿主的应答细胞在迁移到组织之前对血管壁有更强的粘附。目前，血管内和血管外组织中，不同群细胞间的粘附性相互作用的分子基础的研究已获得较大进展，粘附性相互作用控制着炎症和免疫反应的开始到结束的全过程。炎症中细胞粘附分子的基本作用，可用白细胞整合素基因

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

异常的病人为例来说明，这种疾病称为白细胞粘附力缺陷(LAD)，与易感染以及导致极严重的牙周疾病——乳牙和恒牙早失密切相关。

一、生物反应修饰剂对细胞粘附分子的调节

细胞粘附分子在细胞膜上由细胞因子和其他的生物反应修饰剂，通过诸多不同的方式精确调节。粘附分子对刺激的反应可在数秒至数天后发生。细胞粘附分子是炎症和免疫反应中细胞相互作用的通用介质。

(一)对细胞表面表达细胞粘附分子数目的调节

1.细胞表面细胞粘附分子表达增加

(1)整合素分子：在体外将多形核白细胞暴露于补体片段 C_5 a、N－甲酰甲硫亮氨酸苯丙氨酸(fMLP)和乙酸肉豆寇酸盐大戟二帖醇(PMA)，可引起胞浆颗粒迅速脱颗粒与胞膜融合，并诱导细胞表面 $\alpha_2\beta_2$ 整合素的表达，数量增加 5～10 倍。$\alpha_2\beta_2$ 整合素的胞浆池存在于不同的多形核白细胞颗粒群中，在细胞膜中这些颗粒的合并依赖于不同浓度和种类的刺激剂。记忆 T 细胞的细胞膜上，$\alpha_1\beta_2$ 整合素分子平均超过 300 000 个；而幼稚的 T 细胞胞膜上则只有 50 000～60 000个这样的分子。

(2)选择素分子：将内皮细胞暴露于组胺后，P－选择素从内皮细胞的分泌颗粒迅速转移到细胞表面，3 分钟后最大限度地表达；受凝血酶刺激后数分钟内重新内在化；受自由基刺激后，P－选择素的表达更持久。内皮细胞在体外经 IL－1 和 TNF－α 诱导后表达 E－选择素：1 小时内细胞内检测到 mRNA 和蛋白质，峰值出现在 2～4 小时，大约在 24 小时回复到基线水平。另外，在体内注射 IL－1α，也可明显诱导 E－选择素在皮肤微血管内皮细胞上的表达。注射内毒素到狒狒的皮下，2 小时内可诱导 E－选择素在局部血管上的表达。

(3)免疫球蛋白超家族分子：各种生物反应修饰剂，包括白细胞介素－1(IL－1)、干扰素－γ(IFN－γ)、肿瘤坏死因子－α(TNF－α)以及脂多糖(LPS)，可增加 ICAM－1 在内皮细胞上的表达，峰值约在 24 小时处，可持续至少 72 小时。体外用 IL－1、IFN－γ、TNF－α 和 LPS 处理角质细胞，也可诱导 ICAM－1 的表达。IL－1、IL－4、TNF－α 和 LPS 可诱导 VCAM－1 在内皮细胞上的表达，峰值在大约 6 小时，在 48～72 小时内降到低水平。VCAM－1 相对于 ICAM－1 来说表达时间短。IFN－γ 上调细胞粘附分子的表达具有选择性，可诱导 ICAM－1 在内皮细胞上表达，但不能诱导 E－选择素或 VCAM－1 在内皮细胞上表达。在上述功能的基础上，IL－1 和 TNF 尚可增强内皮细胞对淋巴细胞和多形核白细胞的粘附，而 IFN－γ 诱导 T 淋巴细胞对内皮细胞的粘附。不同细胞对不同细胞因子的敏感性不同，例如，IL－1 和 IL－4 诱导人脐静脉内皮细胞表达 VCAM－1，而不能诱导人皮肤微血管内皮细胞表达 VCAM－1。

2.细胞表面细胞粘附分子表达的减少 当人粒细胞和 T 淋巴细胞暴露于佛波酯、细胞因子和生长因子时，其 L－选择素表达减少。鼠 MEL(人 L－选择素的对应体)暴露于趋化因子或佛波酯后，4 分钟内从鼠多形核白细胞膜上脱落。人多形核白细胞暴露于粒细胞—巨噬细胞集落刺激因子(GM－CSF)、TNF、fMLP 和白细胞素(leukotrine)B4 时，也获得相似结果。在 L－选择素从人多形核白细胞上脱落之前，L－选择素的亲和力增加，L－选择素的脱落与 $\alpha_2\beta_2$ 的上调暂时相关。选择素和整合素的关系是长久的，因为多形核白细胞上 E－选择素和其配体的相互作用可由内向外传递信号激活 $\alpha_2\beta_2$。在人血浆中测量了 P－选择素和 L－选择素的可

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

溶形式，可溶性P－选择素能阻止β_2介导的多形核白细胞对静止内皮的粘附，从而阻止循环多形核白细胞的激活。细胞粘附分子的可溶形式作为治疗疾病的药物是有用的。例如，有人研究显示，可溶性ICAM－1体外可阻断鼻病毒感染。

（二）许多刺激对β_2整合素的亲和力的增强作用

循环细胞表面的$\alpha_1\beta_2$不与ICAM－1或其任何已知配体结合，新分离的静止（resting）白细胞，即使它们表达$\alpha_1\beta_2$和ICAM－1也不聚集。此结果提示，这些反受体（counterreceptors）的1或2种以非活化形式存在。许多介质可引起表达$\alpha_1\beta_2$和$\alpha_2\beta_2$的细胞活化，和各种膜受体的交叉连接，这些整合素即转化为高亲和性状态，此时能够结合其配体。例如，T细胞受体的CD3成分的交叉连接（cross－linking）激活T细胞上的$\alpha_2\beta_2$。激活物使$\alpha_1\beta_2$亲和力的变化在不到1分钟内发生，5～10分钟达到高峰。但是，在LFA－1和ICAM－1初步结合后，LFA－1对其配体ICAM－1的亲和力进一步增加。$\alpha_1\beta_2$对其配体的亲和力受β链的胞浆结构域的调节，并涉及蛋白激酶C与整合素或其他相关蛋白的磷酸化的关系。作为这些胞浆事件的结果，在分子的细胞外部分发生失活形式向活化形式转化的构象变化，这可用免疫学的方法检测到。没有证据表明$\alpha_1\beta_2$配体（ICAM－1、ICAM－2、ICAM－3）表达活化形式。

白细胞整合素α链上有3个阳离子结合位点。镁离子是影响这些分子激活和失活的最重要的阳离子。镁离子引起$\alpha_2\beta_2$分子的构象变化，使$\alpha_2\beta_2$在不依赖于其他的细胞激活物情况下，对其配体纤维蛋白原和X因子的亲和力增加10倍。细胞的损伤导致细胞内储存的镁离子释放，从而产生聚集的炎症细胞粘附性增加。

（三）细胞膜上细胞粘附分子分布的构象变化

用PMA刺激多形核白细胞使在细胞膜上的$\alpha_2\beta_2$无序分布变为一系列小的紧密的成簇分布，这种分布与多形核白细胞暂时结合C_3b包被的红细胞有关，可启动细胞吞噬作用。而fM-LP刺激多形核白细胞上调$\alpha_2\beta_2$数目，但$\alpha_2\beta_2$不表现成簇分布。$\alpha_2\beta_2$的成簇现象，被认为是结合配体并启动细胞吞噬作用信号的前提。$\alpha_2\beta_2$介导的结合和细胞吞噬涉及2种不同的$\alpha_2\beta_2$分子亚族，介导靶结合的亚族在细胞膜内是易变的，而介导细胞吞噬的其他亚族是固定的。新生儿的多形核白细胞的细胞膜上$\alpha_2\beta_2$的移动性，显著低于成人的多形核白细胞的$\alpha_2\beta_2$的移动性，可能与新生儿多形核白细胞的趋化性较成人的降低有关。

总之，细胞膜上细胞粘附分子成簇状分布，可显著影响细胞对带有合适配体的任何表面的接触效力，甚至相同细胞粘附分子的亚簇在细胞膜上易位的能力不同，这可能是细胞粘附分子与细胞骨架的连接不同的结果。

（四）不同的细胞群体中细胞粘附分子的糖基化

尽管淋巴细胞和多形核白细胞均表达L－选择素，但只有从多形核白细胞纯化的L－选择素才能结合E－选择素。这是因为多形核白细胞上的L－选择素有岩藻糖糖基化的乳糖胺sLex，它是E－选择素和P－选择素的碳水化合物配体，而淋巴细胞上的L－选择素则没有。ICAM－1的分子量变异，反应了55 kDa核心蛋白有不同细胞特异性的N－糖基化。ICAM－1上的N端连接的寡糖侧链的大小影响它与$\alpha_2\beta_2$的结合，但不影响它与$\alpha_1\beta_2$的结合。

总之，细胞粘附分子与其配体相互作用的机制较多，反应了细胞—细胞和细胞—基质相互作用的多样性和动态性。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

二、细胞粘附分子信号传递功能

细胞粘附分子不是被动地作为粘附配体，而是参与许多信号跨膜传递功能，包括“由外向内”和“由内向外”的信号传递。整合素和其配体的相互作用通过“由外向内”的信号传递，使几种蛋白质的酪氨酸磷酸化。$\alpha_2\beta_2$ 产生的由外向内信号可作为 T 细胞受体/CD3 复合体的共同刺激因子，导致 IL－2 依赖的 T 细胞增殖。ICAM－1、ICAM－2 和 VCAM－1 与各自的配体结合也对 T 细胞上 CD3 复合体起共同刺激信号的作用。与之相反，β_2 整合素自身的选择性磷酸化是来自其他细胞表面分子的各种“由内向外”信号的结果，如交叉连接的 T 细胞受体的 CD3 成分。β_2 整合素的磷酸化与整合素分子的亲和力变化有关。E－选择素与其配体结合激活 β_2 整合素，提供一个“由内向外”信号传递的例子，即 1 种细胞粘附分子被激活，进而激活另 1 个细胞粘附分子，介导随后的功能。

三、炎症和免疫反应中细胞粘附分子的功能

（一）多形核白细胞与内皮的粘附相互作用

在高切应力条件下，体内多形核白细胞开始粘附血管内皮，形成多形核白细胞沿血管壁的特征性的“滚动接触”现象。体外模型证实这些滚动接触是由选择素介导的，整合素的作用很小。E－选择素和多形核白细胞上的配体相互作用激活这些细胞上的 $\alpha_2\beta_2$。最初的滚动接触导致较强的粘附作用，使多形核白细胞停止在内皮细胞表面。$\alpha_1\beta_2$ 和 $\alpha_2\beta_2$ 整合素主要参与对内皮细胞的稳定粘附。例如，未受刺激的多形核白细胞可与 IL－1 激活的内皮稳定地结合，这种结合部分是由多形核白细胞上的 $\alpha_1\beta_2$ 介导的。fMLP 刺激多形核白细胞导致 $\alpha_2\beta_2$ 介导的粘附增加，高于未受刺激的多形核白细胞的粘附水平。对 C_5a、TNF 或二丁酸佛波醇（phorbol dibutyrate）刺激的多形核白细胞与未受刺激内皮细胞的粘附作用的研究也得出了相似的结果：α_1（CD11a）、α_2（CD11b）和 ICAM－1 的抗体均抑制多形核白细胞与内皮细胞稳定结合，β_2（CD18）的抗体几乎完全阻断粘附。联合应用抗体阻断粘附后，发现 $\alpha_2\beta_2$ 介导的多形核白细胞粘附不是由内皮细胞上的 ICAM－1 介导的。E－选择素对多形核白细胞有趋化性，其可溶形式可在细胞表面直接影响多形核白细胞。多形核白细胞最初的滚动接触，为血细胞通过血管壁渗出所需较强的整合素介导的粘附相互作用提供了条件。

有几位学者研究了体外多形核白细胞渗出的分子基础，观察到 $\alpha_1\beta_2$ 的抗体有一致的抑制作用，而 $\alpha_2\beta_2$ 的抗体的抑制作用变化较大。

体内用细胞粘附分子抗体阻断血管外部位的细胞聚集，可以明确单个细胞粘附分子在宿主反应中的作用。利用细胞粘附分子抗体阻断细胞粘附分子和其配体的相互作用来治疗疾病具有潜在的应用价值。Harlan 总结了 30 多项研究，在这些研究中，细胞粘附分子抗体能减小动物体内的组织破坏，从心脏同种移植排斥到内毒素休克引起的血管损伤和死亡。$\alpha_2\beta_2$、β_2（CD18）和 ICAM－1 的抗体，有效地阻断 PMA 刺激引起的多形核白细胞在兔肺中浸润；给小鼠注入免疫球蛋白和 gp90mel 的可溶性嵌合分子，可显著抑制多形核白细胞移动到注入刺激剂硫羟乙酸盐的小鼠腹腔内；每日输入 ICAM－1 抗体，降低了哮喘类人猿模型的嗜伊红细胞浸润和气道的高敏感性。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

（二）淋巴细胞与内皮的粘附相互作用

免疫球蛋白家族中的 ICAM－1、ICAM－2 及 VCAM－1，在 T 细胞粘附血管内皮及 T 细胞游走穿过血管内皮中发挥着重要功能。淋巴细胞结合到未受刺激的内皮这一过程，几乎完全由 $\alpha_1\beta_2$ 与 ICAM－2 之间的相互作用介导。若内皮细胞事先被细胞因子所激活，结合的淋巴细胞数目则显著增加。增加的结合大多数是由 $\alpha_1\beta_2$ 和 ICAM－1 的相互作用介导的，与细胞因子上调 ICAM－1 的表达而不上调 ICAM－2 的表达相一致。但在白细胞粘附缺陷患者（LAD），尽管淋巴细胞表达 $\alpha_1\beta_2$ 的量显著下降，但是淋巴细胞游走入血管外组织的功能并不因此严重受损；同时有学者发现，用 $\alpha_1\beta_2$ 抗体只能阻断部分外周血淋巴细胞对静止的或者激活的人脐静脉内皮细胞的粘附，因而这些学者倾向于认为，在淋巴细胞对内皮的粘附中有 $\alpha_1\beta_2$ 非依赖性粘附分子参与。体外研究发现，VCAM－1 对 T、B 淋巴细胞 $\alpha_1\beta_2$ 非依赖性结合至内皮起作用，VCAM－1 分子加速 LAD 患者中淋巴细胞的迁移。至于 $\alpha_1\beta_2$ 究竟在何种程度上有利于淋巴细胞粘附至内皮上，目前尚未达成共识。实验证实，被 TNF 及 IL－4 刺激过的内皮细胞与淋巴细胞相结合是通过 VCAM－1 介导机制实现的；但如果改用 TNF 及 IFN－γ 刺激内皮细胞，则结合主要是通过 $\alpha_1\beta_2$ 介导机制。VCAM－1 还介导单核细胞、嗜碱性粒细胞、嗜酸性粒细胞及自然杀伤细胞对内皮细胞的粘附，但其在淋巴细胞游走穿过内皮中并无作用。

E－选择素除了有把多形核白细胞粘附至内皮细胞的功能外，还介导记忆 T 细胞粘附至内皮细胞，这种介导与 T 细胞的活化状态无关。E－选择素还可与皮肤归巢记忆 T 细胞的独特亚群结合，机制是通过 E－选择素与该类细胞所表达的皮肤淋巴细胞相关抗原（CLA）之间的相互作用。

（三）宿主应答细胞间的粘附相互作用

淋巴细胞许多功能的发挥均需要 $\alpha_1\beta_2$，包括 T 辅助细胞和 B 淋巴细胞应答反应、自然杀伤、单核细胞和多形核白细胞介导的抗体依赖性细胞毒性、白细胞对成纤维细胞及上皮细胞的粘附等。细胞毒性 T 细胞通过 LFA－1/ICAM－1 依赖机制与其靶细胞结合。$\alpha_2\beta_2$、$\alpha_3\beta_2$ 在髓细胞粘附到其他细胞和配体中起重要作用，髓细胞粘附后在补体活化和凝血链式反应中变为不可溶性。$\alpha_2\beta_2$ 是调理素的受体，促进吞噬细胞摄取 iC_3b 结合的颗粒和细胞。此外，$\alpha_2\beta_2$ 结合单核细胞和多形核白细胞表面的 X 因子，协调 X 因子活化为 Xa 因子，从而启动凝血酶的链式反应，导致纤维素迅速形成。

（四）单核细胞和多形核白细胞与上皮细胞的粘附相互作用

尽管正常皮肤的角质细胞不表达 ICAM－1，但在各种皮肤病状态时，包括接触过敏性皮炎、银屑病和 T 细胞淋巴瘤，角质细胞也表达 ICAM－1。体外实验发现，IFN－γ 和 TNF－α 细胞因子上调角质细胞上的 ICAM－1 的表达。ICAM－1 是调节 T 淋巴母细胞粘附于经 IFN－γ 处理的角质细胞表面的主要分子，该结合可被 $\alpha_1\beta_2$ 的抗体或 ICAM－1 的抗体完全抑制。能结合角质细胞的 T 淋巴母细胞主要为 CD8 亚群，B 淋巴细胞不能结合角质细胞。经 IFN－γ 处理的角质细胞诱导同种细胞毒性 T 细胞对其水解增强，这是由角质细胞 ICAM－1 和 T 细胞相关的 $\alpha_1\beta_2$ 介导。因此推测，牙龈组织中的细胞毒性 T 细胞通过 ICAM－1 介导途径对牙周袋上皮产生破坏是可能的。

多形核白细胞粘附上皮细胞的分子基础的研究几乎没有，这可能是由于多形核白细胞在皮肤疾病中的作用没有单核细胞显著的缘故。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第三节　口腔疾病与细胞粘附分子

一、炎症性关节疾病中细胞粘附分子的作用

炎症介质可调节细胞—细胞外基质的相互作用。细胞—细胞外基质相互作用产生的生物效应是构成各种炎症疾病过程的基础,包括关节炎性皮疹。炎症反应在伤口的愈合过程中起重要作用。IL－1 等细胞因子动员细胞群清除组织碎屑,参与随后愈合过程的细胞事件。许多细胞事件与整合素调节分化表达的作用有关。例如炎症反应时 IL－1 和 TNF－α 活化循环单核细胞,使其获得整合素受体,以致能粘附于炎症血管内皮细胞。作为对炎症细胞因子的反应,内皮细胞表达 VCAM－1,VCAM－1 是 $\alpha_4\beta_1$ 整合素的配体。此过程可能加速活化的单核细胞和巨噬细胞进入周围的炎症组织中。白细胞按这种方式被动员起来清除组织碎屑和抗击感染。

在一定情况下,炎症反应对疾病过程本身负主要责任。在关节炎性皮疹时,细胞因子介导产生金属蛋白酶,金属蛋白酶降解基质中的关键成分,导致软骨基质的破坏。软骨基质的缺失降低了受累组织的弹性,这些病态结构不能承受关节行使功能时的压力,产生进一步损伤。炎症细胞因子上调其他细胞外因子的表达,进而加剧关节损伤。体外实验发现,IL－1 能增加各种类型细胞的纤连蛋白的合成,纤连蛋白可逆地抑制软骨细胞表型的表达;外源性纤连蛋白可抑制软骨细胞Ⅱ型胶原蛋白和软骨蛋白聚糖的合成。炎症关节结构内的细胞比正常关节结构内的细胞组织更多的纤连蛋白进入其细胞外基质内。体外暴露于纤连蛋白的软骨细胞表达Ⅰ型胶原蛋白,软骨细胞转变为具有成纤维细胞样细胞特征的细胞。炎症关节软骨组织中纤连蛋白缺乏或者被蛋白聚糖掩盖,而完整的软骨蛋白聚糖具有抑制细胞结合纤连蛋白包被的底物的能力。总之,在炎症性关节疾病中,金属蛋白酶降解软骨基质;炎症过程增加了这些疾病组织中纤连蛋白的含量,通过抑制软骨形成细胞的表型表达来限制缺失软骨的修复。

整合素可能参与与炎症关节疾病有关的细胞活性的调节,某种整合素的表达上调可能参与诸如血管翳和白细胞外渗的过程。此外,整合素的分化表达构成纤连蛋白调节软骨细胞表型表达的基础。

二、牙周组织疾病中细胞粘附分子的作用

(一)细胞粘附分子在牙周疾病发病中的作用

体内外的研究结果表明,在牙周病变的全过程中均有细胞粘附分子的参与。细胞粘附分子参与龈组织的体液免疫及细胞免疫;参与吞噬被破坏的细胞;参与纤维素沉积,从而促进病变组织的修复。可溶性细胞粘附分子影响龈组织内细胞间的相互作用,也影响龈沟或牙周袋内细菌与细胞间的相互作用。

有关多形核白细胞与上皮细胞之间的相互作用及细胞粘附分子在牙周袋/龈沟环境中的可能作用,还是一个有待于研究的重要领域。

(二)细胞粘附分子在牙周疾病防治中的作用

显然,细胞粘附分子在炎症和免疫反应中发挥着重要而有益的作用。将其用于疾病的治疗以减少组织的损伤,必须选择合适的治疗对象,且依疾病的不同选择合理的治疗方法。在真

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

正用于临床治疗之前，尚有许多问题需要明确，包括选择合适的细胞粘附分子类型或抗原决定簇、阻断方法及治疗持续时间等。无论如何，大量的事实使我们充分相信，在不久的将来，对细胞粘附分子进行选择性调节，是抗炎治疗的有效方法。对牙周病的治疗，主要是选择性阻断这些分子的组织破坏作用。某些细胞粘附分子介导有益的和有害的两面作用，选择性阻断细胞粘附分子上一个配体结合的抗原决定簇，而保持另一个配体结合的抗原决定簇的完整性，则可只发挥其有益作用。细胞因子或其他介质可诱导或激活局部细胞粘附分子，这一特性有助于调节细胞粘附分子活性，减少治疗的副反应。

用反义 mRNA 技术可以获得调节基因、RNA 或蛋白质。将细胞粘附分子抗体的片段与人免疫球蛋白结合形成嵌合分子后，其半衰期较结合前的相应抗体的长得多。体外实验中用反义构建体可抑制 ICAM－1、VCAM－1 和 E－选择素的表达；细胞粘附分子的可溶性重组物或细胞粘附分子衍生肽，可在蛋白质水平上对 ICAM－1 进行阻断。如果是阻断选择素，则可采用合适的糖类。目前已研制出既保留结合 iC_3b 性能，又能阻断多形核白细胞结合活化内皮细胞的可溶性重组 $\alpha_2\beta_2$。

三、整合素在口腔癌中的作用

恶性肿瘤的特征为细胞无限制生长、浸润周围组织和具有远处转移的能力。肿瘤的局部浸润和转移依赖于细胞外基质蛋白与宿主细胞的相互作用。受累器官的血小板、内皮细胞和其他组织细胞产生蛋白水解酶，包括纤维蛋白溶酶原激活物和基质金属蛋白酶家族，可降解细胞外基质和基底膜，有助于肿瘤的浸润和转移。

细胞增殖、粘附、浸润和转移不是肿瘤的独特行为，也可见于其他过程如胚胎形成、伤口愈合、滋养层种植、乳腺退化、炎症和组织重塑，提示肿瘤细胞的病理行为是由于正常功能的调节异常所致。许多上述过程皆由整合素—配体相互作用介导。整合素表达缺失或增加，可能从生理上改变细胞的粘附性质，使细胞对调节信号失去反应，导致细胞不可控制的生长、增殖和移动。

与正常细胞相比，恶性细胞的整合素表达发生了改变。但在恶性表型转化中，没有特异的整合素改变，整合素表达的改变根据肿瘤的类型不同而异。整合素表达的改变涉及肿瘤生长、浸润和转移等方面。

不同的口腔癌和同一口腔癌的不同区域，整合素的表达不同，但共同的是 $\alpha_2\beta_1$、$\alpha_3\beta_1$、$\alpha_v\beta_5$ 和 $\alpha_6\beta_4$ 整合素的局部或广泛的缺失，尤其在分化差的病损中。

在口腔癌中，虽然胞浆 $\alpha_6\beta_4$ 整合素表达增多可能伴随恶性程度增高，但 $\alpha_6\beta_4$ 整合素在基底细胞的基底面缺失伴随基底膜蛋白的缺失。可能口腔癌内 $\alpha_6\beta_4$ 整合素明显高表达不代表该整合素真正上调，而反应了肿瘤细胞极化 $\alpha_6\beta_4$ 整合素，无力粘附半桥粒。

口腔癌较正常上皮更倾向于表达 α_v，在乳腺癌和肾癌中的 α_v 表达改变。尽管在正常上皮中，α_v 亚单位只与 β_5 链形成二聚体，但在口腔癌中，它可与 5 种不同的 β 链（β_1、β_3、β_5、β_6 和 β_8）形成二聚体。口腔癌 $\alpha_v\beta_5$ 表达减少，但 $\alpha_v\beta_6$ 从头表达。$\alpha_v\beta_6$ 也表达于创口愈合过程，因而它在细胞的转移中起重要作用。β_6 在胎儿发育时也表达，且见于许多上皮肿瘤中，$\alpha_v\beta_6$ 通过 β_6 亚单位的胞浆结构域促进结肠癌细胞增殖。

缺乏 $\alpha_v\beta_5$ 的口腔癌细胞系终末分化能力下降，显示锚着独立生长的能力。用 α_v 亚单位转

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

染该细胞系恢复了 $\alpha_v\beta_5$ 的表达，通过抑制锚着独立生长逆转了恶性表型，恢复了终末分化的能力。说明 $\alpha_v\beta_5$ 缺失使细胞对此受体传导的调节信号不发生反应，导致分化能力丧失和不能控制的生长。

口腔癌的整合素表达变化非常复杂。粘附力的缺失使细胞失去聚集力，$\alpha_v\beta_5$ 的缺失与分化减少和锚着独立生长有关。同时，$\alpha_v\beta_6$ 的从头表达和极化的 $\alpha_6\beta_4$ 的缺失在肿瘤的进展中起重要作用。但通过转染 β_4 亚单位修复缺乏 β_4 的细胞系，不影响细胞的生长或细胞分化。

培养的人粘膜角质细胞表达基质金属蛋白酶(MMP－2 和 MMP－9)，而整合素亚单位 β_1 和 β_3 的抗体可刺激 MMP－9 的表达。口腔癌细胞系也产生 MMP。所以，整合素在口腔癌中的作用方式可能与其他组织癌相似，即调节蛋白分解酶的产生，使基底膜降解，细胞浸润结缔组织。

目前，尚不能用整合素的表达来判断肿瘤的分级和预后，但发现 $\alpha_6\beta_4$ 表达增加的肿瘤易转移至局部淋巴结。推测，对口腔癌中 $\alpha_v\beta_6$ 从头表达的研究可使我们深入理解口腔癌增殖、侵袭和转移。今后的工作应该着重探讨整合素的表达和功能是怎样调节的，尤其应该阐明 $\alpha_6\beta_4$ 和 α_v 整合素在口腔癌中的作用。

四、粘附分子和口腔大疱性疾病

近年来，已深入研究了角质细胞之间和角质细胞与基底膜复合体的细胞外基质间的粘附分子。粘附分子负责维持细胞的稳定性，是负责细胞的形态嵌合体，在细胞的分化、移动和信号传导中有重要作用。当各种粘附分子突变，或它们成为免疫球蛋白结合、补体固定和白细胞释放的蛋白水解酶的靶子时，细胞即丧失稳定性。

角质细胞间的连接装置为桥粒，角质细胞与基底膜复合体的连接装置为半桥粒。天疱疮和类天疱疮是异质性的疾病实体，其表现型可能相似。

(一)粘附分子与天疱疮组疾病

1.*桥粒的结构*　桥粒由 3 组粘附蛋白构成：①细胞骨架成分，包含细胞角蛋白和肌动蛋白；②浆膜下斑，包含桥粒芯蛋白(desmogleins)、斑珠蛋白(plakoglobins)和连环蛋白(catenins)；③细胞外桥粒芯蛋白 1、2、3，为钙粘附素(cadherin)类蛋白或糖蛋白，与相邻细胞桥粒装置的同源末端犬牙交错。

2.*天疱疮组疾病的靶抗原*　天疱疮组疾病包括寻常型天疱疮、落叶型天疱疮、天疱疮样棘层松解病、疣状脓性口腔炎和副肿瘤性天疱疮，其共同特征为细胞与细胞间粘附缺失，产生棘层松解。对天疱疮组疾病而言，靶抗原为相同的粘附分子。主要天疱疮组疾病的靶抗原见表 8－5。推测当抗体结合这些靶抗原时，它们从空间上干扰其结合特性，导致细胞—细胞分离。

(二)粘附分子与类天疱疮组疾病

1.*半桥粒的结构*　半桥粒与桥粒相似，由 3 种成分组成，但细胞骨架成分不同，半桥粒的粘附分子与桥粒的粘附分子在生化上也不相同。半桥粒从胞浆开始，穿过浆膜下斑到细胞外透明板。半桥粒成分包括：①细胞角蛋白；②斑蛋白(plaque protein)，包括大疱类天疱疮抗原 1(BPA1)，BPA1 是一种与桥粒斑蛋白(desmoplakins)相关的蛋白；③跨细胞 BPA2，它是 XⅦ型胶原蛋白和 α_6、β_4 整合素，二者均为透明板层粘连蛋白，包括层粘连蛋白 5(epiligrin)的细胞外配体。透明板层粘连蛋白是三分子十字形蛋白，与致密板Ⅳ型胶原蛋白结合。Ⅳ型胶原蛋白依

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

次提供Ⅶ型胶原蛋白的球形部分的结合位点，Ⅶ型胶原蛋白作为锚状纤维埋入表皮和固有层成熟的Ⅰ型和Ⅱ型胶原中。

表 8－5　桥粒粘附分子靶抗原

疾　病	靶抗原
寻常型天疱疮	桥粒芯蛋白 3(130 kDa 糖蛋白)
IgA 天疱疮	桥粒芯蛋白 2a,b(105,115 kDa 蛋白)
叶型天疱疮	桥粒芯蛋白 1(165 kDa 糖蛋白)
副肿瘤性天疱疮	桥粒斑蛋白Ⅰ(250 kDa 斑蛋白)
	桥粒斑蛋白 Ⅱ(210 kDa 斑蛋白)
	其他 170 kDa、190 kDa 未知抗原
脓性皮炎/脓性口腔炎	?
Vegetans	

2.*类天疱疮组疾病的靶抗原*　类天疱疮组疾病的特征为上皮与基底膜分离而形成大疱性病损或剥脱性病损。迄今为止，仅在一种遗传性表皮松解性大疱性疾病中，发现了编码Ⅶ型胶原蛋白的基因发生突变，最近尚报道 BPA2 和ⅩⅦ型胶原蛋白的基因突变。其他类天疱疮组疾病的免疫病理，为产生针对基底膜复合体的各种特异性成分的免疫球蛋白。此组疾病已被证实的靶抗原见表 8－6。上皮与基底膜分离可能由抗体单独结合发生，或在一些疾病中补体固定伴浸润白细胞释放酶破坏基底膜。

表 8－6　半桥粒粘附蛋白靶抗原

疾　病	靶抗原
大疱性类天疱疮	BPA 1(230 kDa 斑蛋白),BPA 2(180 kDa ⅩⅦ型胶原蛋白)
妊娠性类天疱疮	BPA 2(180 kDa ⅩⅦ型胶原蛋白)
Antiepiligrin 疤痕性类天疱疮	层粘连蛋白 5,epiligrin(170,145,125 kDa 蛋白)
疤痕性/粘膜类天疱疮	各种未知抗原包括 BPA 2
线形 IgA 病	45,97 kDa 抗原?
获得性大疱性表皮松解症	Ⅶ型胶原蛋白(290 kDa)
红斑性大疱性天疱疮	Ⅶ型胶原蛋白(290 kDa)

（聂敏海　武云霞）

参考文献

1　Milam SB, Haskin C, Zardeneta G, *et al*. Cell Adhesion Proteins in Oral Biology, Cri Rew Oral Bio Med, 1991,2(4): 451－491

2　Hynes RO. Integrins: A Family of Cell Surface Receptors, Cell, 1987,48: 549

3　Kleinman HK, Cannon FB, Laurie GW, *et al*. Biological Activities of Laminin, J Cell Biochem, 1985,27: 317

4　Ruoslahti E and Pierschbacher MD. New Perspectives in Cell Adhesion: RGD and Integrins, Science, 1987,238: 491

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

5 Thomas GJ, Jones J and Speight PM. Integrins and Oral Cancer, Oral Oncology, 1997,33(6): 381
6 Crawford JM, Watanabe K. Cell Adhesion Molecules in Inflammation and Immunity: Relevance to Periodontal Diseases, Cri Rew Oral Bio Med, 1994,5(4): 91 – 123
7 陈谦明,李秉琦.口腔粘膜大疱性疾病的分子发病机制及临床意义.华西口腔医学杂志,1998,16(3):279
8 Dabelsteen E, Molecular Biological Aspects of Acquired Bullous Diseases. Crit Rew Oral Biol Med,1998,9(2): 162 – 178
9 陈谦明,李秉琦. 类天疱疮样扁平苔藓及副肿瘤性天疱疮.中华口腔医学杂志,1999,34(5):317

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

第九章 细胞角蛋白与口腔疾病

第一节 细胞角蛋白的基本特征

细胞骨架由微丝(直径 6 nm)、中间丝蛋白(直径 7～11 nm)和微管(直径 25 nm)组成,中间丝蛋白因其直径介于微丝和微管之间而得名,是细胞骨架的主要组成成分之一。Moll 等将中间丝蛋白分为 5 种:①细胞角蛋白(cytokeratin),是上皮细胞的特征;②波形蛋白(vimentin),见于间充质衍生的细胞如星形细胞、血管平滑肌细胞等;③结蛋白(desmin),见于肌细胞;④神经纤维丝(neurofilaments),见于神经细胞;⑤胶质纤维丝(glial filaments),见于星形胶质细胞。

一、细胞角蛋白的分类和结构

(一)细胞角蛋白的分类

细胞角蛋白是中间丝蛋白(又名居间纤维)的组成成分。根据其分子量和等电点分为 2 型,Ⅰ型细胞角蛋白呈酸性,分子量较小,为 40～60 kDa,等电点为 4.9～6.1,包括编号为 9～20 的角蛋白多肽;Ⅱ型细胞角蛋白呈碱性或中性,分子量较大,为 50～70 kDa,等电点为 6.0～7.8,包括编号为 1～8 的角蛋白多肽。

通常,细胞角蛋白以“角蛋白对”的形式在组织中出现,角蛋白对由一个Ⅰ型角蛋白分子与另一个分子量比其高约 8 kDa 的Ⅱ型角蛋白分子组成。各角蛋白多肽的分子量、编号、等电点及配对关系见表 9－1。

表 9－1 细胞角蛋白的分子量、等电点、编号和配对关系

Ⅰ型角蛋白(酸性)			Ⅱ型角蛋白(碱性或中性)		
编号	分子量(kDa)	等电点	编号	分子量(kDa)	等电点
9	64	5.4			
10	56.5	5.3	1/2	65/67	7.8
11	56	5.3			
12	55	4.9	3	64	7.5
13	51	5.1	4	59	7.3
14/15	50	5.3/4.9	5	58	7.4
16	48	5.1	6	56	7.8
17	46	5.1	7	54	6.0
18	45	5.7	8	52	6.1
19	40	5.2			
20	46	6.1	8		

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

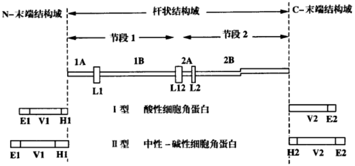


图 9－1　细胞角蛋白多肽的结构模型

(二)角蛋白多肽的结构

角蛋白多肽(如图 9－1 所示)由氨基末端结构域(头部)、杆状结构域和羧基末端结构域(尾部)组成,中间杆状结构域由 α－螺旋组成,含 310～315 个氨基酸残基,其大小、二级结构和序列具有很大的保守性,而各多肽之间主要表现为氨基和羧基末端的大小和序列不同。如图 9－1 所示,杆状结构域由 4 个 α－螺旋束(1A、1B、2A、2B)组成,每个螺旋束拥有 1 个类 7 价序列(a－b－c－d－e－f－g)n,a 位和 d 位 75% 以上由非极性氨基酸残基占据,而其他位置则由极性氨基酸残基占据。7 价序列易形成卷曲螺旋。4 个螺旋束中间有 3 个接头,L1 连接 1A 和 1B 形成节段 1;L2 连接 2A 和 2B 形成节段 2;L12 连接节段 1 和节段 2 形成杆状结构域。α－螺旋束和接头的确切大小和序列决定细胞角蛋白的类型。同型多肽链的同源性达 70%～95%,但不同型的多肽链同源性不到 30%。α－螺旋束的大小不同。L1 的长度和序列不同,为非螺旋;L12 易形成片层;L2 为螺旋但无 7 价序列。1B 束具有 9.55 个氨基酸残基的周期性,节段 2 具有 9.85 个氨基酸残基的周期性,此为决定高级结构的特征。节段 1 和节段 2 均长约 22 nm,由接头 L12 连接成约 47 nm 的杆状结构域。杆状结构域的共同特征:在近 1A 束开始处有 2～3 个、节段 2 末端有 4～5 个高度保守的 7 价序列;在 2B 束中间附近的 7 价序列有一精确的保守断点。末端结构域可以再分为亚结构域:H 亚结构域为具有高度同源性的区域;V 亚结构域为可变区;E1 和 E2 亚结构域为高电荷末端。Ⅱ型角蛋白的 H1 和 H2 亚结构域分别有 36 和 20 个氨基酸。Ⅰ型角蛋白有一短而可变的 H1 亚结构域,而无 H2 亚结构域。复层鳞状上皮的 V1 和 V2 亚结构域富含甘氨酸和丝氨酸,而单层上皮的 V1 和 V2 则富含丝氨酸和苏氨酸。E1 和 E2 亚结构域均为碱性,在不同种的相同角蛋白中具保守性,而不同的角蛋白却变化很大。V1 和 E1 亚结构域通常比 V2 和 E2 更大,更具碱性,含有更多的甘氨酸和丝氨酸。

(三)细胞角蛋白的装配

角蛋白装配的形式不太清楚,据已有的资料可作如下推测:一条Ⅰ型角蛋白多肽链与另一条Ⅱ型角蛋白多肽链形成 1 个两条链的卷曲螺旋分子,此两条链轴向平行,依靠 7 价重复序列 a 位和 d 位上的非极性氨基酸残基的疏水作用维持稳定。1 对两条链的卷曲螺旋分子进一步形成四聚体,此为在溶液中能稳定存在的最小聚合体——原丝,其直径为 3 nm,2 条原丝缠绕形成直径 4.5 nm 的原纤维,之后 2～6 条(最常见为 4 条)原纤维形成 1 条完整的中间丝。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

二、细胞角蛋白的基因结构及其表达调控

（一）细胞角蛋白的基因结构

细胞角蛋白是由多基因家族编码，非常复杂。尽管不同角蛋白的基因差别较大，但不同种的相同角蛋白基因，尤其是内含子，却具有高度保守性。人细胞角蛋白基因位于不同的染色体上，Ⅱ型角蛋白基因位于12号染色体上，Ⅰ型角蛋白基因位于17号染色体上。目前获得的角蛋白基因通常从人cDNA文库中克隆而来。一般Ⅰ型角蛋白基因有8个外显子和7个内含子，但K19例外，有6个外显子和5个内含子。Ⅱ型角蛋白基因有9个外显子和8个内含子，K8亦例外，只有7个内含子。两型角蛋白基因图谱分别位于不同的染色体上，意味着"角蛋白对"的联合表达，不是因为两型角蛋白基因在染色体上位置接近或偶联的关系，可能是通过共同的反式作用因子在转录水平调节其共同表达（图9－2，图9－3）。反式作用因子可与AA(Pu)CCAAA序列结合。

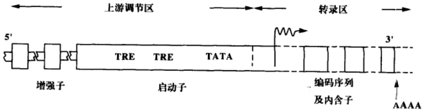


图9－2　角蛋白的基因结构

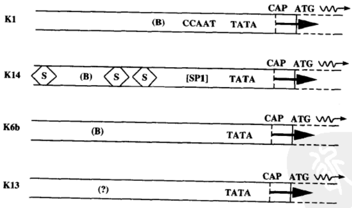


图9－3　角蛋白基因的启动子

由上至下为腭粘膜和表皮基底层上皮细胞的K1启动子、基底细胞的K14启动子、腭部上皮基底上层细胞的K6b启动子、颊粘膜基底上层K13启动子

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

在所有角蛋白基因序列翻译起始密码的上游约 30 bp 处，均包含有 TATA 盒（RNA 聚合酶Ⅱ的结合位点），但在上游序列中没有发现明显相同的，编码基底细胞和基底上层细胞表达的角蛋白的序列。但是，在人、牛和鼠的角蛋白基因序列中发现了一致序列 AA(Pu)CCAAA，此序列亦存在于人套膜蛋白基因和一些乳头瘤病毒基因中，但不存在于单层上皮角蛋白基因中。该序列作为复层上皮特异因子（如 CEⅠ和 CEⅡ结合蛋白）的结合位点，对角蛋白组织特异性表达可能有重要作用。影响转录的其他序列有时位于内含子内。K10 的第一个内含子有 1 段具有调节功能的保守序列。其他的调节序列可能直接或间接调节维 A 酸、钙等联合调节角蛋白对表达的反应。

（二）细胞角蛋白基因表达的调控

细胞角蛋白的表达具有区域特异性和分化特异性，其表达受到精密的调节，说明角蛋白基因内一定存在调节表达的关键序列。与基因相互作用并调节基因表达的可溶性蛋白因子称为反式（*trans*）信号（转录激活物和阻抑物），而基因上游调节区域内的基因成分称为顺式（*cis*）信号。

1. *细胞角蛋白基因表达的转录水平调控*　转染研究和转基因小鼠的研究，已用于探索角蛋白基因内的调节序列，该两种技术通过缺失分析研究基因的部分上游调节区域。

（1）转染研究：转染研究依赖于含上游调节元件的重组 DNA 克隆的构建，重组 DNA 克隆还含有目的基因或容易检测到的报告基因，常使用氯霉素乙酰转移酶（CAT）基因。只有转录激活物存在于转染细胞，和它们的结合位点被包括在转染构建体内时，CAT 基因才活跃表达。这是决定启动子区域大小和证实增强子序列的有效检测方法。

细胞角蛋白基因启动子位于紧邻基因编码序列的上游，包含以组织特异性、发育特异性和分化特异性方式转录必需的结合位点。许多基因有 1 000 bp 大小的启动子。增强子是短的 DNA 序列，可离启动子稍远，或者位于启动子、内含子内，或者甚至位于 3′侧翼序列上。增强子元件以独立位置方式增强转录，即增强子可位于下游或更上游或在非编码链上，但仍然起作用。用 CAT 报告基因检测，Blessing 等发现牛角蛋白基因Ⅳ（与 K6 相似）的启动子约 600 bp，在 −600 和 −180 位置之间有 1 个与 mRNA 转录开始有关的区域。该区域容许角蛋白基因在牛和小鼠上皮细胞中表达，而不能在成纤维细胞中表达，因而它激活细胞型特异性表达。杂交基因构建体含牛Ⅰa（K1）和Ⅵb（K10），在此基因控制下，Ⅳ启动子和增强子稳定地转染入单层上皮细胞并高表达。受体单层上皮细胞正常时不表达这些角蛋白。

尽管转染的效率很低（2% ~ 5%），但暂时性转染仍是用来探讨角蛋白表达的有效方法。成纤维细胞中Ⅱ型角蛋白 K5 的表达导致Ⅰ型伴侣 K14 的表达，与正常分化时Ⅱ型角蛋白的表达先于Ⅰ型角蛋白伴侣表达的现象一致。说明角蛋白表达存在一些类型的交叉对调节信号，此调节似乎发生于转录后水平。当 K8/K18 联合表达于成纤维细胞或转化细胞时，两者均稳定，并形成纤维，而单独存在时，每一种均不稳定。

（2）转基因小鼠的研究：用显微注射法把克隆 DNA 注入受精的小鼠卵中产生转基因小鼠，是证实组织特异性基因需要的顺式作用调节序列的一种方法。研究携带约 2 kb 上游调节序列的人 K1 基因在转基因小鼠中的表达，发现人 K1 基因的表达见于皮肤，但不表达于胃、肝脏和脑。在皮肤内，K1 mRNA 和蛋白质主要见于基底上层细胞，此外，人 K1 基因在发育 15 天时表达，与小鼠中 K1 基因表达的时间相同。提示此含 K1 基因和 2 kb 上游序列的 DNA 片段，有一些组织特异性、分化特异性和发育特异性的信号，这些信号对小鼠上皮中的转录激活物起反

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

应。与此相似，携带约 2.5 kb 上游侧翼序列的 K14 基因，在转基因小鼠中以组织特异性的方式被调节。此基因正常时随分化而下调，转基因小鼠的表皮基底上层细胞显著下调，而舌和食管中的 K14 则变化较多。

2. *细胞角蛋白基因表达的翻译水平的调控* 通常认为，角蛋白基因的调控是在转录或转录后水平，但也有在翻译水平调控的报道。用免疫组织化学和原位杂交方法，检测口腔上皮和食管上皮 K4、K8、K14、K15、K18、K19 蛋白和 mRNA 的表达，发现 mRNA 阳性的分布较广，蛋白阳性不与 mRNA 阳性平行。配对的 K8 和 K18 在食管上皮的不同层次中，其 mRNA 浓度不同，说明 K8 和 K18 的合成不是偶联的。

免疫组织化学方法可确定蛋白在细胞和组织中的位置，可表明蛋白起作用的部位。原位杂交可确定所研究蛋白的 mRNA 的位置，因而证实活化基因转录部位。特殊角蛋白的 mRNA 的定位，与用免疫组织化学定位的蛋白不一定相符，因为一些蛋白在缺乏活跃的合成时仍存在于细胞内，而 mRNA 的寿命通常很短；相反，mRNA 可储存但不翻译。K5 和 K14 的 mRNA 在表皮和口腔粘膜的基底细胞中能检测到，但其水平在基底上层细胞中下降，尽管可用生化的方法检测到其蛋白。因而，当细胞进展到其分化表型时，基底细胞的 mRNA 即不再表达，遗留的 K5 和 K14 的 mRNA 被降解。

所有研究可得出 3 个结论：①基底细胞特异角蛋白 mRNA 表达随分化而下调；②分化特异性角蛋白的表达调节主要发生于基因的转录水平；③不同角蛋白 mRNA 的表达不同反应了组织特异性分化的区域复杂性和精细。

第二节　细胞角蛋白的表达部位及其抗体

一、细胞角蛋白的表达部位、抗体及其影响因素

（一）细胞角蛋白的表达部位

细胞角蛋白通常以“角蛋白对”的形式表达于上皮细胞，在任何上皮细胞中，至少有每一亚家族的 1 个成员表达。特殊的角蛋白对通常表达于不同类型的上皮组织中，最低分子量的角蛋白存在于单层上皮和腺上皮中，中间大小的角蛋白存在于复层上皮，最大分子量的角蛋白存在于角化上皮。细胞角蛋白是上皮分化的标志，见表 9－2。

表 9－2　上皮分化的角蛋白标志

分化类型	角蛋白	
	Ⅱ型（碱性）	Ⅰ型（酸性）
复层上皮	5	14
角化	1/2	10/11
非角化	4	13
过度增殖	6	16
角膜	3	12
单层上皮	8	18,19

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

(二)细胞角蛋白表达的抗体

目前,已研制出多种角蛋白抗体,其抗原特异性、染色部位和染色形式见表9-3。

表9-3　角蛋白抗体小结

……的标志	抗体	抗原	组织染色形式		
			腭	颊	表皮
所有上皮(多种角蛋白)	AE1:K10,11,14,15,19(大多数Ⅰ型)		(基底)基底上层	基底层	基底层
	AE3:K1,2,3,4,5,6,7,8(所有Ⅱ型)		所有层	所有层	所有层
	LP34		所有层	所有层	所有层
复层上皮					
一般	34BE12	K5	所有层	所有层	所有层
基底层	PKK1	K19(K8,18)	基底层	基底层	基底层
	PKK2	K19			
基底上层(角化)	AE2	K1,10	基底上层	阴性	基底上层
	SC10	K1			
	KL1	55-57 kd 角蛋白			
	LH2,3	K10			
	RKSE60	K10			
	8.60	K10			
基底上层(非角化)	AE8	K13	基底上层斑片状	基底上层	阴性
	1C7	K13			
	2D7	K13			
	6B10	K4			
	GB10	K4			
过度增殖	LMM3	K16	基底上层	阴性	阴性
	抗 psi3		基底上层	NT	阴性
角膜	AE5	K3			
毛发	AE13		舌背乳头	舌	
单层上皮	LE41,M20	K8	分离的Merkel细胞	阴性	阴性

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

续表

……的标志	抗体	抗原	组织染色形式		
			腭	颊	表皮
	CAM5.2	K8			
	35BH11	K8			
	LE61,MC28	K18			
	PKK3	K18			
	RCK105	K7			
	LP1K	K7,8			
	PKK1	K8,18,19			
单层和部分复层上皮	LP2K	K19	分离的Merkel 细胞	基底层	阴性
	抗 40K	K19	上皮钉突尖处的基底细胞	基底层	阴性
	KS19.1	K19		基底层	阴性

(三)影响角蛋白表达的因素

复层上皮的分化调节受许多因素的影响,包括邻近的间充质、细胞外基质成分、生长因子和维 A 酸。

1.结缔组织的作用

(1)结缔组织对成人口腔上皮的影响:即使在成人中,结缔组织对口腔上皮分化形式仍有影响。通过异型组织重组,以及对组织结构、角蛋白纤维形式和细胞表面抗原的分析获得了更多的证据,提示结缔组织可对口腔上皮提供允许信号和指导信号。

腭部结缔组织埋入牙槽粘膜下的实验证实,体内结缔组织对成人口腔上皮有影响。在移植的结缔组织上再生的上皮变为角化咀嚼上皮,浅层结缔组织似乎影响角蛋白的表达:出现 K1 和 K10,而 K4 和 K13 缺失。而皮下移植研究证实,深层结缔组织对维持和引导上皮分化无影响。这些结果表明:上皮和结缔组织之间的相互作用,对于决定结缔组织中控制上皮分化形式和基因表达的因子有重要作用。对上皮和间充质相互作用的分子基础需进一步研究,角蛋白和其他分化标志是此项研究中极端重要的工具。

(2)结缔组织对发育中的腭部的影响:在发育过程中,上皮—间充质的相互作用控制许多上皮组织和上皮衍生结构的发生。腭板的器官培养是一个良好的研究系统,通过中间边缘上皮细胞的程序性死亡而使两块腭板融合。腭板相背的两面上,鼻上皮表达 K8/K18,而硬腭上皮表达 K10。腭板融合需要几个信号,包括 cAMP、上皮生长因子(EGF)、细胞外基质成分、其他生长因子和类维生素 A。上皮的一些变化只在间充质存在时才发生,强调了此系统中上皮—间充质相互作用的重要性。Ⅸ型胶原蛋白是细胞信号传导的加速因子,转化生长因子 TGF-α和 TGF-β 可调节其表达,在中间边缘分化的信号传导时表达于细胞表面。尽管此系统比较复杂,但此系统对进一步研究上皮—间充质相互作用、细胞外基质和生长因子在调节上

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

皮分化中的作用以及探讨特异性的基因对这些因子的反应有巨大的潜力。

2. 维生素A和类维生素A的作用

(1)对皮肤和口腔粘膜的影响：维生素A(视黄醇)和其相关的化合物是上皮分化的重要调节因子(图9-4)。类维生素A过多对胎儿和成人的口腔上皮和皮肤均有影响，但以对口腔的影响更大。皮肤局部应用维A酸可导致毛发脱落、皮肤脆性增加和角化不全，其作用与类维生素A的剂量和特殊类型有关。伴随维生素A的水平升高，仓鼠(hamster)颊囊经历粘膜化生和角化抑制的组织学变化。啮齿类胎儿的口腔和皮肤上皮也对类维生素A显示分化反应。培养6~13天的皮肤显示表皮变薄和毛囊数量减少，但角化速度与体内相似。与之对照，腭和舌的移植物首先形成角化层，然后脱落，随后分泌粘液和形成杯状细胞。因而，过量的维A酸对口腔上皮分化的影响较对表皮分化的影响更大。

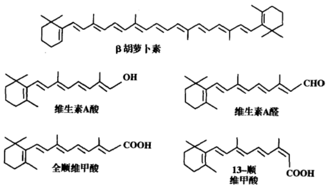


图9-4 β胡萝卜、维生素A及其活性代谢产物的结构

(2)体外维A酸对分化特异性上皮产物表达的影响：培养的角质细胞对类维生素A的反应与维生素A在终末分化中的调节作用相一致。与3T3饲养细胞共同培养的新生儿角质细胞的早期研究显示，脱脂除去培养血清中的维生素A可增强复层化和表达K1、K10/K11。对表皮、结合膜和阴道上皮的角质细胞的研究也得出相似的结果。加入视黄醇乙酸(retinyl acetate)可逆转这些效应。当过量类维生素A存在时，K13和K19的表达增加。

维生素A可调节角蛋白基因转录。类维生素A存在时，培养的角质细胞不产生K1和K10的mRNA。维A酸可上调K13、K15和K19，轻微下调K6、K16和K17，而K4、K5和K14不受影响。说明各个角蛋白对类维生素A的反应不同。类维生素A是间接调节角蛋白的表达。

(3)类维生素A对上皮分化机制的调节：体内维生素A以与血清视黄醇结合蛋白(SRBP)结合成复合体的形式参与循环，在血清中由运甲状腺素蛋白(transthyretin，一种前清蛋白)携带。类维生素A在靶组织中与细胞相互作用，进入细胞后则与另一种胞液中的结合蛋白形成复合体。维A酸进入细胞核，可通过核受体蛋白与靶基因作用(图9-5)。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

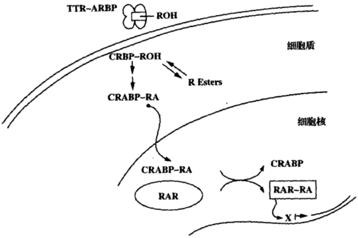


图 9-5 维 A 酸类物质的作用机制

TTR:血清前清蛋白;SRBP:血清视黄醇结合蛋白;CRBP:细胞视黄醇结合蛋白;CRABP:细胞维 A 酸结合蛋白;RAR:维 A 酸受体;R Esters:R-酯类

①细胞结合蛋白:在许多类型细胞中均发现,类维生素 A 有两种细胞内结合蛋白——细胞视黄醇结合蛋白(CRBP)和细胞维 A 酸结合蛋白(CRABP)。两种蛋白的分子量均约为 15.5 kDa,可加速细胞内视黄醇的运输。几种类维生素 A 结合蛋白结构上的相似性提示,它们是相关类维生素 A 和脂肪酸结合蛋白家族的成员(表 9-4)。

表 9-4 类维生素 A 结合蛋白

名　称	缩　写	配　体	大小(kDa)
血清视黄醇结合蛋白	SRBP	视黄醇	20.5
细胞视黄醇结合蛋白	CRBP	视黄醇	15.7
细胞视黄醇结合蛋白(肠型)	Ⅱ型 CRBP	视黄醇	15.6
细胞维 A 酸结合蛋白	CRABP	维 A 酸	15.5

CRBP 少量存在于表皮、真皮和口腔粘膜。CRABP 在对维 A 酸敏感的组织中含量非常丰富,在皮肤、肾上腺、睾丸和子宫中,CRABP 的浓度高,定位于皮肤的表皮;也存在于培养的角质细胞,并在分化的角质细胞中显著增加。CRABP 在上皮的分化中可能有重要作用,可调节维 A 酸转移至细胞核内。但是,过多的类维生素 A 会抑制终末分化,表皮中存在大量的结合蛋白仍是矛盾的事情。可能是 CRABP 隔绝维 A 酸,阻止其进入细胞核内。结合维 A 酸的 CRABP 与未结合维 A 酸的 CRABP 的比率,对类维生素 A 的功能或类维生素 A 转移至核受体蛋白中可能起关键作用。

口腔粘膜对类维生素 A 的代谢和反应不同于表皮。颊粘膜含 CRABP 是正常成人表皮含 CRABP 水平的 4 倍,但 CRBP 的水平相似,均为低水平。口腔组织中 SRBP 的命运不同,在颊粘

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

膜中活化的 SRBP 停留于组织内;而在表皮中,类维生素 A 的结合能力丧失。因而,SRBP 在介导组织内类维生素 A 的效应中可能起重要作用。下述研究结果支持这个认识:在粘膜生化检测中,用结合有 SRBP 的类维生素 A 处理培养器官显示弱效应;表皮细胞与复合物一起时摄取的视黄醇,为与游离类维生素 A 一起时摄取的 1/15 ~ 1/20 倍。但是,有关类维生素 A 的转运和组织利用的一些重要问题尚未解决。

②核受体:维 A 酸进入细胞核,在细胞核内与染色质或核蛋白相互作用。此过程涉及核维 A 酸受体蛋白,最初,这些受体是用激素受体 DNA 结合结构域的探针从 λgt11 cDNA 文库中克隆出来。推测类维生素 A 受体与其他核受体蛋白,特别是激素和甲状腺素结合受体相似,可能有 DNA 结合结构域。这些受体属于 DNA 结合蛋白超家族,对维 A 酸起反应,称为维 A 酸受体(RARs)。

从人和啮齿动物文库中克隆出种不同的 RAR:RARα 普遍表达,RARβ 强烈表达于肾脏、脊索、脑皮质、前列腺和胚胎,RARγ 是皮肤的主要受体。组织特异性和分化特异性的类维 A 酸效应,很可能是通过此核受体家族介导的。

二、口腔粘膜上皮的角蛋白表达

口腔内衬粘膜,粘膜是身体和外环境的结构边界。粘膜分为 3 种主要类型:牙龈和硬腭的咀嚼粘膜,颊和唇的衬里粘膜,舌背和唇红边缘的特殊粘膜。尽管每种粘膜均可抵抗机械损伤,但其上皮在组织学、厚度方面明显不同,分化适合于部位的功能需要,作为防止有害物质或治疗物质穿透的屏障的有效性也明显不同。上皮由不断更新的角质细胞群构成,其增殖局限于基底细胞层。基底上层细胞经历区域特异性的形态学和生化变化。咀嚼上皮的成熟细胞经历角化分化形式,而衬里粘膜不角化,但仍然有不同的分化形式,称为非角化分化,特殊区域呈现混合分化形式。细胞角蛋白是上皮分化的标志物之一,其表达具有组织特异性、区域特异性和分化特异性。

(一)正常口腔上皮中细胞角蛋白的表达

用免疫组织化学和生化技术研究阐明了口腔组织中细胞角蛋白的分布特征。所有复层上皮的基底层表达角蛋白 K5/K14,而细胞离开基底层后即开始表达分化标志。细胞角蛋白的表达反应了口腔上皮的复杂性。

1. *颊和舌腹上皮中细胞角蛋白的表达* 颊和舌腹上皮均为非角化上皮,其基底层细胞表达角蛋白 K5/K14,在部分区域还散在表达 K19,基底上层细胞开始表达非角化标志 K4/K13。

2. *牙龈上皮中细胞角蛋白的表达* 牙龈上皮的基底层细胞表达角蛋白 K5/K14;附着龈上皮为角化上皮,其基底上层细胞表达 K6/K16 和 K1/K10;而龈沟上皮和龈缘上皮与非角化的颊粘膜一样,表达 K4/K13。结合上皮角蛋白的表达与基底细胞更相似。因而,用结构蛋白标志判断,牙龈的 3 种不同上皮成分显示不同的分化形式(图 9 - 6)。

结合上皮是独特的组织,其作用为粘附软组织到牙表面。结合上皮细胞表达典型的复层上皮的 K5 和单层上皮的 K8/K18 角蛋白,也表达 K19。K19 均匀地分布于结合上皮的根尖部分,但是,在结合上皮的冠方,K19 在邻近结缔组织的基底细胞和直接粘附于牙表面的细胞中呈强阳性表达,但在结合上皮内表达较弱。尽管根据形态学标准通常把结合上皮描述为不分化的上皮,但其不同部位角蛋白表达的不同形式表明结合上皮正经历分化,提示当结合上皮细胞离开结缔组织或牙面时经历分化。

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

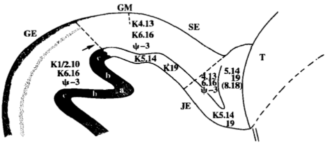


图 9-6 角蛋白在牙龈上皮的表达示意图

a:K5,14,19;b:K5,14;c:K5,14,ψ3;GE:牙龈上皮;GM:龈缘上皮;SE:龈沟上皮;JE:结合上皮;T:牙面。角蛋白在牙龈上的表达呈现明显不同的三个类型

3.*硬腭上皮中细胞角蛋白的表达* 硬腭上皮为角化上皮,其基底层细胞表达角蛋白 K5/K14,基底上层细胞表达 K6/K16 和 K1/K10。

4.*舌背上皮中细胞角蛋白的表达* 舌背的特殊粘膜上皮是口腔组织具有复杂的形态学和角蛋白表达形式的典范。在啮齿类动物中,舌背分化形式的区域变化尤其显著,丝状乳头的前份和后份以及乳头间区域各显示独特的角蛋白表达。乳头后份形成硬表面,含独特的与毛发相似的角蛋白;乳头间区域角蛋白表达与颊上皮一样;乳头前份,组织学上用角质素和角化来评价,与硬腭和牙龈最相似;用免疫组织化学和原位杂交方法检测,发现其与颊上皮的角蛋白表达相似,也与一些表皮型角蛋白相似。与 K1/K10 典型的共表达形式不同,K1 和 K10 似乎分别表达于舌的不同区域。在乳头后份,K10 可与类似毛发角蛋白的角蛋白形成复合体;而在乳头前份,K1 可与 K13 相互作用。K13 正常情况下与非角化分化有关。

5.*Merkel 细胞* Merkel 细胞是牙龈、唇和腭粘膜内的特殊细胞,具有触觉受体功能或与上皮的神经支配有关,对它们所在组织的分化形式不起作用。Merkel 细胞可用神经内分泌细胞标志证实。此外,角蛋白抗体也可使 Merkel 细胞染色。Merkel 细胞含典型的单层上皮角蛋白 K8/K18 和 K1。Merkel 细胞中含有角蛋白,支持 Merkel 细胞是由上皮而非神经嵴细胞衍生而来的这一认识。

(二)口腔癌前病变和口腔癌中的角蛋白表达

1.*动物诱癌过程中细胞角蛋白的动态变化* 叙利亚金黄地鼠颊囊癌发生模型可能是与人类口腔癌发生最为相似的动物系统。用免疫组织化学、电泳和 Western 杂交方法,检测 DMBA 处理的金黄地鼠颊囊的各个病变时期的组织,发现正常颊囊上皮基底层细胞表达 K14,基底上层表达 K13,而未检测到 K1;自单纯增生起,K14 不再局限于基底层而表达于分化细胞中,K13 在整个过程中持续存在;而 K1 自 2 周开始在基底上层成弱斑片状表达,8 周后表达增强而且均匀,但在鳞状细胞癌中却几乎缺乏 K1,仅见于少数分化很好的细胞;分子量为 42~56 kDa的细胞角蛋白增加,而分子量为 62~75kDa 的细胞角蛋白减少。电泳分析发现异常45 kDa 和54 kDa 的细胞角蛋白新带。动物实验说明,在粘膜癌变过程中,组织特异性的 CK 发生了变化并出现了异常 CK。

2.*人口腔粘膜癌前病变和口腔癌中细胞角蛋白的变化* 细胞角蛋白具有高度保守性,原

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频,微信公众号里搜索qzkqsp1(茄子口腔视频1首字母)即可关注

发癌和其转移癌除部分保留原正常上皮细胞角蛋白的特征外，发生了一些变化，但尚未得出一致结论。

(1)组织特异性细胞角蛋白表达减少或增加：轻度上皮异常增生时，K13 成簇细胞表达，随细胞异型性增加而缺失，在过角化区，K13 消失而表达 K10；中度和重度上皮异常增生时，上皮全层细胞 K14 阳性，而 K13、K10 阴性；正常与异常交界处上皮细胞联合表达 K14 和 K13；癌前病变中 K1 表达增加，但与病理学诊断的异常增生分级之间无明显联系。口腔癌中分化相关的细胞角蛋白 K1/K10 和 K4/K13 表达减少或缺失，K5/K14 表达也有下降的趋势，K14 普遍存在但更不均匀。在分化良好的口腔癌中 K13、K10 散在阳性，而邻近癌的上皮 K13 表达正常；低分化口腔癌 K10 和 K13 完全缺失；在高度未分化癌中，表达于正常粘膜的 K5、K6/K11、K14/K15 缺失，与其不良预后有关。

K14 在口腔粘膜癌前病变和口腔癌中的改变不仅发生在蛋白水平，而且也发生在其 mRNA 水平。上皮异常增生的白斑中，K14 mRNA 较正常粘膜和癌中的高，而口腔癌中 K14 mRNA 较正常粘膜和白斑中的低，说明癌变后 K14 mRNA 的转录下降。

(2)单层上皮细胞角蛋白在口腔粘膜癌前病变和口腔癌中的异常表达：K8/K18、K19 为单层上皮的标志，K8/K18 通常不表达于口腔粘膜，K19 可以散在表达于口腔非角化上皮的基底细胞。中和重度上皮异常增生时，不论有无角化，基底上层细胞 K19 均强阳性，K19 阳性细胞层数与异常增生程度成正相关。在口腔癌中，K19 呈斑片状表达，提示基底上层表达 K19 可作为口腔癌前病变的标志。在口腔癌前病变和口腔癌中，K8/K18 表达的阳性率也显著增加。K8/K18 和 K19 在口腔癌前病变和口腔癌中持续的异常表达，对口腔粘膜癌前病变和口腔癌的诊断及预后判定可能有重要意义。

(3)角蛋白对失去成对性：在口腔癌前病变和口腔癌中，部分角蛋白不再成对表达。异常增生的白斑表达 K1、K4、K14，而未表达其对子 K10、K13、K5，在口腔癌中，表达 K1 而未表达 K10。

(4)出现细胞角蛋白的降解产物：采用电泳和 Western 杂交的方法研究，发现异常增生的白斑出现分子量为 38 kDa、40 kDa 、42 kDa 的蛋白条带。38 kDa 蛋白与 K19 的单克隆抗体反应，认为 38 kDa 蛋白质是 K19 的降解产物；40 kDa 蛋白不与 K19 单克隆抗体反应，而与广谱角蛋白抗体反应；42 kDa 蛋白亦与广谱角蛋白抗体反应。这些条带均为较大的角蛋白的降解产物。但这些降解产物产生的机制和意义尚不清楚，有待于更深入广泛的研究。

3. 存在的问题　细胞角蛋白是细胞骨架的组成成分，含有 20 种不同的多肽，其分布因细胞类型和分化程度而不同，因而相当复杂。因角蛋白抗体种类较多，甚至 1 种角蛋白有几种抗体，各位学者使用的抗体不尽相同，得出的结果也不完全一致。细胞角蛋白为多基因家族编码，其基因位于不同染色体的不同位点上，目前对其基因和基因表达及表达调控的研究尚待深入。尽管发现细胞角蛋白在口腔癌前病变和口腔癌中的表达发生了改变，但这种改变发生的机制和与癌基因之间的关系尚不清楚。

(聂敏海　陈谦明)

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

参考文献

1 Dale BA, Salonen J, and Jones AH. New Approaches and Concepts in the Study of Differentiation of Oral Epithelia, Cri Rev Oral Bio Med, 1990, 1(3): 167

2 Velden LA, Schaafsma HE, Manni JJ, *et al*. Cytokeration Expression in Normal and (Pre)malignant Head and Neck Epithelia: An Overview. Head & Neck, 1993, 15: 133

3 Cooper D, Schermer A, Sun TT. Biology of Disease: Classification of Human Epithelia and Their Neoplasms Using Monoclonal Antibodies to Keratins: Strategies, Applications and Limitations. Laboratory Investigation, 1985, 52(3): 243

4 Steinert PM, Roop DR. Molecular and Cellualr Biology of Intermediate Filaments. Ann Rev Biochem, 1988, 57: 593 – 625

5 Maeda H. Keratin Staining Pattern in Clinically Normal and Diseased Oral Mucosa of Lichen Planus Patients. Scand J Den Res, 1994, 102: 210

6 Odgen GR, Chisholm DM, Adi M, *et al*. Cytokeratin Expression in Oral Cancer and Its Relationship to Tumor Differentiation. J Oral Pathol Med, 1993, 22: 82

7 Kannan S, Balaram P Chandran GJ, *et al*. Alterations in Expression of Terminal Differentiation Markers of Keratinocytes during Oral Carcinogenesis. Pathobiology, 1994, 62: 127

8 Balm AJ, Hageman PC, wan Doornewaard MH, *et al*. Cytokeration 18 Expression in Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. Eur Arch Otorhinolaryngol. 1996, 253(4 – 5): 227

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

汉英词汇索引

（以汉语拼音为序）

A

α－淀粉酶		7……147
$\alpha_1\beta_1$ 整合素		8……162
$\alpha_2\beta_1$（VLA2）整合素		8……162
$\alpha_3\beta_1$（VLA3）整合素		8……162
$\alpha_4\beta_1$ 整合素		8……163
$\alpha_5\beta_1$ 整合素		8……163
$\alpha_6\beta_1$ 整合素		8……164
$\alpha_1\beta_2$ 整合素		8……164
$\alpha_2\beta_2$ 整合素		8……164
$\alpha_3\beta_2$ 整合素		8……164
阿糖腺苷		4…… 88
adh		4…… 65
癌基因		5…… 96
癌前损害	1……17	6……142
asd 基因		4…… 68

B

Ⅷ型胶原蛋白		8……181
白细胞介素－1α		1…… 7
白细胞介素－1β		1…… 7
半乳糖苷酶基因		6……138
报告基因		4…… 88
bcl－1	1……5	5…… 99
变性梯度凝胶电泳		2…… 24
β3 整合素亚家族		8……164
β2 整合素亚家族		8……164
病毒癌基因		5…… 95
病毒插入		5…… 98

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

波形蛋白		9……190
BVDU		4…… 89

C

C－myc	1……4	1…… 4
Cc[γ] 转移		4…… 70
CCND1		5……100
CD44		8……172
CDKN2 基因		5……107
cDNA		2……11
层粘连蛋白	8……166	8……174
CEPH		2…… 17
插入		2…… 17
成纤维生长因子		3…… 47
重组载体		6……130
触角蛋白		8…… 9
串联重复序列		3…… 35
唇腭裂		3…… 55
次要衣壳蛋白		1…… 89
cint－2		1…… 4
簇蛋白		3…… 31
CYP 酶		5……125
Cystatins		7……147

D

蛋白的编码基因		4…… 79
蛋白质缩短		2…… 26
单纯疱疹病毒	6……138	4…… 77
单细胞凝胶电泳分析		5……128
decorin		3…… 54
等位交换技术		4…… 58
等位交换突变		4…… 73
dex 基因		4…… 63
第二顺序动力学		4…… 61
点蛋白		7……154
转化酶		4…… 67
点突变	5……98	2…… 6

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

定位克隆		2…… 21
DNA		2…… 9
DNA 斑点杂交		1…… 6
DNA 测序		2…… 19
DNA 定位图谱		2…… 12
DNA 多态性		2…… 13
DNA 克隆		2…… 16
DNA 扩增		2…… 15
DNA 探针	2……12	1…… 4
DNA 修复		5……105
DNA 修复基因		5……111
DNA 指纹		5……74
doc – 1	5……105	1…… 5
Don 核酸外切酶		4…… 68
多种肿瘤抑制基因		5……107
Dlx		3…… 48

E

E – 钙粘附素		8……171
E – 选择素		8……169
EB 病毒		1…… 4
(EGFR)/c – erb B1		1…… 4
ems – 1	5……101	1…… 5
Ⅱ型胶原蛋白		8……180

F

反义寡核苷酸技术		6……140
反意义链		2…… 9
放射自显影		2…… 12
放线共生放线杆菌	4……4	4…… 7
非纤丝形胶原蛋白		8……180
分子生物学		1…… 3
分子医学		1…… 3
fru A		4…… 65
ftf 基因		4…… 63
富谷蛋白		7……147
富酪氨酸造釉蛋白多肽		3…… 34

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

富酪蛋白 7……150
富亮氨酸造釉蛋白多肽 3…… 45
富脯蛋白 7……150
富脯非造釉蛋白 3…… 31
富组蛋白 7……152
富组多肽 6……144 6……143

G

钙粘附素家族 8……171
杆状结构域 9…… 191
gbp 基因 4…… 67
果聚糖转移酶 4…… 65
功能性克隆 2…… 21
GST 酶 5……125
gtf A 4…… 62
gtf B 4…… 63
gtf C 4…… 65
gtf D 4…… 65
gtf I 4…… 65
gtf S 4…… 65
谷胱甘肽硫基转移酶 5……125
骨连接蛋白 8……177
骨桥蛋白 8……177
骨形成蛋白 3……45 3…… 45

H

化学切割错配方法 2…… 24
环状附加体 4…… 87
磺基乙基甲烷 4…… 58
回复突变 4…… 58
彗星检测 5……128
混杂胶原蛋白 8……181
hst－1 5……99 1…… 5
HSV－1 4…… 77
HSV－2 4…… 77
ICAM－2 8……171 8……170
ICAM－3 8……164 8……167

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

Int－2 5……101 1…… 5
IRES 6……135

J

肌腱蛋白 8……160 8……165
激肽释放酶 7……148
基因解码 2…… 24
基因扩增 5…… 99
基因敲掉 5…… 21
基因图 2…… 22
基因图谱 4…… 23
基因治疗 6……130 1…… 5
检查点 5……103
简单序列重复 2…… 22
剪切转录 6……134
缰蛋白 8……165
酵母菌人工染色体 1…… 1
酵母人工染色体克隆 2…… 9
胶原蛋白 8……179 8……167
胶质纤维丝 9……190
结蛋白 9……190
聚合酶链反应 2…… 15
聚合酶链反应－单链构象多态性 1…… 6

K

K－ras 5…… 98
口腔分子生物学 1…… 3
口腔鳞状细胞癌 6……141
口腔粘膜毛状白斑 1…… 4
口腔粘膜下纤维性变 1…… 6

L

L－选择素 8……169
Lef 1 基因 3…… 47
LFA－1 9……183
类维生素 9……197

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

Ⅵ型胶原蛋白 8……160
6－磷酸蔗糖脱氢酶 4…… 63

M

脉冲场凝胶电泳 2……1 1…… 23
麦芽三碳糖 4…… 73
men－1 5……101 1…… 5
密码子 2…… 9
免疫球蛋白超家族 8……159
膜蛋白 4…… 80
mRNA 的可变剪切 3…… 32
mRNAs 的可变剪切 3…… 32
Msx 1 3……45 3…… 47
Msx 2 3…… 45
Msx 3 3…… 45

N

N－甲基－N－硝基－N－亚硝基胍 4…… 58
N－乙先转移酶 5……125
内氏放线菌 4…… 72
NAT 酶 5……125
逆转录病毒 6……131 5…… 96
逆转录 PCR 检测 5……124
粘性放线菌 4…… 72
凝血酶反应素 1 5……107 1…… 5
nm23 1…… 6

P

P53 基因 5……103 1…… 5
P－选择素 8……169
Pax 基因 3…… 48
皮层蛋白 4…… 79
皮层磷酸化蛋白 4…… 79
PRAD－1 5……99 1…… 5
PTS 4…… 63
葡糖胺聚糖 8……175

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

葡萄糖基转移酶(glucosy ltrans ferase..GTF)基因 1…… 3

Q

桥粒钙粘附素 8……171
Ⅶ型胶原蛋白 8……181

R

染色体步移 2…… 17
染色体定位 2…… 21
染色体分析 2…… 26
染色体核型 2…… 26
染色体转位 5…… 98
ras 基因家族 5……98 1…… 4
RB 基因 1…… 6
人类基因组计划 1…… 2
人类乳头状瘤病毒 5……116 1…… 4
RNA 2…… 9
软骨连接蛋白 8……178

S

腮腺分泌蛋白 7……155
Ⅲ型胶原蛋白 8……180
scrA 4…… 68
scrB 4…… 67
sea 5……101 1…… 5
神经纤维丝 9……191
生长因子 5…… 99
生长因子受体 5…… 90
视黄醇乙酸 9……198
噬菌体载体 2…… 19
双顺子载体 6……135
Ⅺ型胶原蛋白 8……180
Ⅳ型胶原蛋白 8……180
Spa A 基因 4…… 68
Spa P1 4…… 68
Ssa A 基因 4…… 68

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

Ssa B 基因 4…… 68
ssp5 4…… 69
速激肽 3…… 48
宿主细胞再活化 5……127 5……122
Syndecan－I 3…… 55

T

Tenascin 3…… 55
体细胞杂交 2…… 28
童氏突变 3…… 31
突变剂诱导的染色体畸变率 5……126

V

VCAM－1 8……171 8……170 8……163
Von Willebrand 因子 8……164

W

晚期基因 4…… 89
微管 9……191
维生素 A 9……198
微丝 9……191
微卫星体 2…… 22
物理图谱 2…… 22
V 型胶原蛋白 8……180

X

细胞癌基因 5…… 96
细胞凋亡 5…… 54
细胞角蛋白 9……191
细胞间粘附分子－1(ICAM－1) 8……164
细胞粘附分子 8……159
细胞生物合成蛋白 4…… 86
细胞外基质 3…… 54
腺病毒 6……131
纤连蛋白 8……173 8…… 49

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

纤维蛋白原 8……31 8……164
限制性内切酶分析 4…… 74
限制性内切核酸酶 2…… 14
血管紧张肽酶原 7……149
胸腺嘧啶合成编码基因 4…… 83
胸腺嘧啶激酶 5……121
选择素 8……159

Y

牙龈紫质单胞菌 4…… 69
抑癌基因 1…… 5
遗传确定子 4…… 58
Ⅰ型胶原蛋白 8……160
荧光原位杂交技术 2……27 1…… 1
釉柱 3…… 31
原钙粘附素 8……171
钙粘附素相关蛋白 8……171
原位荧光杂交技术 2…… 23

Z

载体 2…… 19
早期蛋白的编码基因 4…… 41
早期基因 4…… 89
造釉蛋白 3…… 31
整合素家族 8……159
质粒 4…… 59
质粒载体克隆 2…… 17
中间普氏杆菌 4…… 69
中间丝蛋白 9……191
肿瘤易感性 5……124 5……127
肿瘤抑制基因 5…… 5
资迅科技 1…… 2
柱间晶体 3…… 31
主要衣壳蛋白 4…… 89
转导 5…… 96
转化 5……96 4…… 60
转染 5…… 17

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注

转化生长因子α 3……33 1…… 5
转化生长因子β1 1…… 6
转基因体系 6……131
致突变剂 4…… 58
紫质单胞菌 4…… 69
组成型外显子 8……172
转基因小鼠 2…… 29
左旋腺病毒序列 6……136

（周　敏）

公众号里每天更新正畸、修复等临床操作视频
口腔视频，微信公众号里搜索qzkqsp1（茄子口腔视频1首字母）即可关注